

**Der Einfluss eines Phosphoenolpyruvat/Phosphat-
Translokators der inneren Plastidenhüllmembran auf
Entwicklungsprozesse in *Arabidopsis thaliana***

Untersuchungen an der *cue1*-Mutante

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Tanja Löttgert
aus Altena**

Februar 2007

Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2007

*Die Wissenschaft ist ewig in ihrem Quell,
unermesslich in ihrem Umfang,
endlos in ihrer Aufgabe,
unerreichbar in ihrem Ziel.*

Karl Ernst von Baer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Isolierung der <i>Arabidopsis thaliana cue</i> -Mutanten	
1.2 Der retikulierte Phänotyp der <i>cue1</i> -Mutante.....	2
1.3 Die Mutation in <i>cue1</i> resultiert in einen Funktionsverlust des Phosphoenolpyruvat/Phosphattranslokators (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran.....	4
1.3.1 Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran.....	4
1.3.2 Die Funktionen weiterer Mitglieder der Phosphat-Translokator- Familie.....	7
1.3.2.1 Der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT).....	7
1.3.2.2 Der Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT).....	7
1.3.2.3 Der Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (XPT).....	8
1.4 Der PPT und seine Bedeutung für den Primär- und Sekundär- stoffwechsel.....	8
1.4.1. PEP als Vorstufe für aromatische Aminosäuren.....	8
1.4.2. Die Synthese von Sekundärmetaboliten aus aromatischen Aminosäuren.....	10
1.4.2.1 Die Synthese von Phenylpropanen und ihre Regulation.....	10
1.4.2.2 Weitere aus aromatischen Aminosäuren abgeleitete Sekundärmetabolite.....	12
1.4.2.3 Die Funktionen der Phenylpropane.....	13
1.4.2.4 Phenylpropane modulieren Signalwege.....	14
1.4.2.4.1 Auxin.....	14
1.4.2.4.2 Cytokinin.....	15
1.4.3 Die Rolle von PEP bei der Synthese von Fettsäuren und verzweigtkettigen Aminosäuren.....	17
1.4.3.1 PEP als Vorstufe für die Synthese von Fettsäuren.....	17
1.4.3.2 PEP als Vorstufe für die Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren.....	18

1.4.4	Die Rolle von PEP in der Bereitstellung von Pyruvat für den plastidären Methylerythritol-Phosphat (MEP)-Stoffwechsel.....	19
1.5.	Auswirkungen des Funktionsverlustes des PPT auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel in <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
1.6.	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material	23
2.1.1.	Chemikalien und Enzyme.....	23
2.1.2.	Kommerzielle Kits.....	23
2.1.3.	Bakterien- und Hefestämme.....	24
2.1.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	24
2.1.3.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
2.1.3.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1.4.	Vektoren.....	25
2.1.5.	Pflanzenmaterial.....	25
2.2	Methoden	26
2.2.1.	Anzucht von <i>Arabidopsis</i> auf Erde.....	26
2.2.2.	Sterilisation des <i>Arabidopsis thaliana</i> Saatguts.....	27
2.2.2.1.	Flüssige Oberflächensterilisation von Samen.....	27
2.2.2.2.	Oberflächensterilisation mit Chlorgas.....	27
2.2.3.	Anzucht von <i>Arabidopsis</i> auf Agar-Platten.....	27
2.2.4.	Pflanzen-Selektionen.....	28
2.2.4.1.	Selektion auf Agarplatten.....	28
2.2.4.2.	Selektion auf Erde mit BASTA.....	28
2.2.5.	Transformation von <i>A. thaliana</i> durch Vakuuminfiltration.....	28
2.2.6.	Fütterung von <i>A. thaliana</i> mit Phytohormonen.....	29
2.2.7.	<u>Mikrobiologische Methoden</u>	29
2.2.7.1.	Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.7.1.1.	Anzucht von <i>E. coli</i>	29
2.2.7.1.2.	Herstellung von TSS-kompetenten Zellen.....	30
2.2.7.1.3.	Transformation von TSS-kompetenten Bakterien.....	31
2.2.7.2.	Anzucht und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32

2.2.7.2.1.	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	32
2.2.7.2.2.	Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien.....	32
2.2.7.2.3.	Elektrotransformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.2.7.3.	Anzucht und Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.2.8.	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	36
2.2.8.1.	Extraktion und Präparation von DNA.....	36
2.2.8.1.1.	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	36
2.2.8.1.2.	Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe.....	38
2.2.8.1.3.	Präparation genomischer DNA nach der CTAB-Methode....	39
2.2.8.4.	Identifizierung von T-DNA Insertionslinien in <i>A. thaliana</i>	40
2.2.8.5.	Elektrophorese von DNA.....	40
2.2.8.6.	Quantifizierung von DNA.....	41
2.2.8.6.1.	Photometrische Quantifizierung von DNA.....	41
2.2.8.6.2.	Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen.....	42
2.2.8.7.	<i>Southern</i> -Blot	42
2.2.8.7.1.	<i>Southern</i> -Blot für genomische DNA.....	42
2.2.8.7.2.	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	43
2.2.8.7.3.	Hybridisierung von <i>Southern</i> -Blots.....	44
2.2.8.8.	Enzymatische Modifikation von DNA.....	45
2.2.8.8.1.	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	45
2.2.8.8.2.	Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren.....	46
2.2.8.8.3.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	46
2.2.8.8.4.	Klonierung in TOPO-TA® Vektoren.....	46
2.2.8.9.	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	47
2.2.8.9.1.	PCR (Standardmethode).....	47
2.2.8.9.2.	PCR-Walking.....	48
2.2.8.9.3.	<i>Colony</i> -PCR.....	50
2.2.8.10.	DNA-Sequenzierungen.....	50
2.2.8.11.	Extraktion und Präparation von RNA.....	51
2.2.8.11.1.	RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode.....	51
2.2.8.11.2.	Isolierung von RNA mit RNase-ALL.....	52
2.2.8.11.3.	Isolierung von RNA mit RNeasy® Plant Mini Kit.....	53

2.2.8.12.	Quantifizierung von RNA.....	53
2.2.8.13.	RT-PCR.....	53
2.2.8.14.	Microarray.....	54
2.2.9.	<u>Biochemische Methoden</u>	54
2.2.9.1.	Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE.....	54
2.2.9.2.	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau.....	56
2.2.9.3.	Proteinfärbung mit Silbernitrat.....	56
2.2.9.4.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	57
2.2.9.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	58
2.2.9.6.	Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen.....	59
2.2.10.	<u>Physiologische Methoden</u>	59
2.2.10.1.	Transportexperimente mit Proteoliposomen.....	59
2.2.10.1.1.	Expression des rekombinanten Proteins.....	59
2.2.10.1.2.	Mechanischer Aufschluss der Hefezellen.....	60
2.2.10.1.3.	Reinigung von His-gekoppelten Proteinen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	61
2.2.10.1.4.	Reinigung des Phospholipids.....	62
2.2.10.1.5.	Rekonstitution der Membranproteine.....	62
2.2.10.1.6.	Messung der Transportaktivität.....	63
2.2.10.2.	Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blatt- und Wurzelextrakten.....	65
2.2.10.2.1.	Aufschluss des Blatt- und Wurzelmaterials.....	65
2.2.10.2.2.	Enolase.....	66
2.2.10.3.	Histologische Lokalisierung von Sekundärmetaboliten.....	67
2.2.10.4.	Analyse der Gehalte an Flavonoiden über HPTLC.....	67
2.2.10.4.1.	Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe.....	67
2.2.10.4.2.	Auftrennung von Flavonoiden über HPTLC.....	68
2.2.11.	Mikroskopie und Dokumentation.....	68
2.2.12.	Internetadressen.....	69
3.	Ergebnisse	71
3.1	Funktionelle Charakterisierung beider PPTs aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.2	<i>Cue1</i> weist ein deutlich verringertes Wurzelwachstum auf.....	73

3.3	Der retikulierte Blattphänotyp der <i>cue1</i> -Mutante kann durch Fütterung mit aromatischen Aminosäuren transient revertiert werden.....	74
3.4	Der <i>cue1</i> -Phänotyp wird durch Fütterung mit einem Neolignan-Glukosid (DCG) revertiert.....	76
3.5	Pfropfungen von <i>A. thaliana cue1</i> - und Wildtyp-Keimlingen.....	78
3.6	Cytokinine revertieren den retikulierten Phänotyp der <i>cue1</i> -Mutante.....	80
3.7	Die Gehalte an Cytokinin in der <i>cue1</i> -Mutante und in Kontrolllinien.....	82
3.8	Fütterung der <i>cue1</i> -Mutanten mit Auxin.....	84
3.9	Induzierbares RNAi für <i>AtPPT1</i> im Wildtyp-Hintergrund.....	85
3.9.1	Entwicklung des retikulierten <i>cue1</i> -Blattphänotyps durch konstitutive Expression des <i>AtPPT1</i> -RNAi-Konstrukts.....	85
3.9.2	Die Generierung Ethanol-induzierbarer <i>AtPPT1</i> -RNAi Pflanzen im Col-0 Hintergrund.....	86
3.10.	Die Suche nach „Kandidatengenen“ mit Hilfe einer genomweiten Expressionsanalyse.....	89
3.10.1	Die Genexpression in Rosetten und Wurzeln der <i>cue1</i> -Mutante im Vergleich zur Kontrolle.....	89
3.10.2	Durch DCG-Fütterung verursachte Veränderungen im Expressionsprofil der <i>cue1</i> -Mutante.....	93
3.10.3	Deregulierung der Genexpression durch einen transienten RNAi-Ansatz.....	101
3.11	Identifizierung von „Zielgenen“ durch einen <i>Activation tagging</i> Ansatz im <i>cue1</i> -Hintergrund.....	104
3.11.1	Die Suche nach <i>cue1</i> -Revertanten.....	104
3.11.2	Kann der retikulierte Phänotyp durch Verstärkung der Expression eines Gens im <i>cue1</i> -Hintergrund kuriert werden?.....	105
3.12.	Die Isolierung von <i>ppdk</i> - und <i>p-enolase</i> -Mutanten sowie Herstellung und Analyse von <i>ppdk x cue1-1</i> und <i>p-enolase x cue1-1</i> Doppelmutanten.....	108
3.12.1	Analyse der Expression von <i>PPDK</i> und <i>p-Enolase</i> in <i>cue1</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	109
3.12.2	Die <i>ppdk</i> und <i>ppdk x cue1-1</i> Mutanten.....	111
3.12.3	Die <i>p-enolase</i> und <i>p-enolase x cue1-1</i> Mutanten.....	114
3.12.4	Bestimmung der Enolase-Aktivität.....	118

3.13	Untersuchungen zum Nachweis von Flavonoiden in der <i>cue1</i> -Mutante.....	118
3.13.1	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flavonoiden in der Wurzel.....	119
3.13.2	HPTLC-Analyse der Gehalte an Flavonoiden in Wurzeln und Blattrosetten.....	120
3.14.	Weitere Ergebnisse.....	122
3.14.1	Die Analyse der NO-Gehalte in <i>cue1</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	122
3.14.2	Die <i>lcd1</i> -Mutante.....	124
4.	Diskussion.....	128
4.1	Die Bedeutung des AtPPT1 und nachgeschalteter Reaktionen für eine korrekte Mesophyllentwicklung.....	128
4.1.1	Durch Fütterung mit DCG und Cytokinin wird der retikulierte <i>cue1</i> -Blattphänotyp revertiert.....	128
4.1.2	Die Auswahl an „Zielgenen“ durch eine genomweite Expressionsanalyse.....	130
4.1.2.1	Das genomweite Expressionsprofil in Blättern und Wurzeln der <i>cue1-1</i> -Mutante.....	130
4.1.2.2	Auswirkungen der DCG-Fütterung auf die Expression in <i>cue1-1</i>	131
4.1.2.3	Ist die <i>cue1</i> -Mutante Cytokinin-insensitiv?	135
4.1.2.4	Ethanol-induziertes RNAi für <i>AtPPT1</i>	141
4.1.2.5	Ausblick.....	143
4.1.3	Die Reversion des <i>cue1</i> -Phänotyps durch Überexpression der Nicotianaminsynthase.....	144
4.2	Welche Auswirkungen hat die Blockade weiterer Reaktionswege zur Bereitstellung von PEP im Plastidenstroma auf die Entwicklung der Pflanze?.....	147
4.2.1	Die Bedeutung der AtPPDK bei der Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg.....	147

4.2.2	Die Auswirkungen des Fehlens einer putativen plastidären Enolase auf die Entwicklung der <i>cue1</i> -Mutanten.....	149
4.3	Die Ausprägung eines <i>cue1</i> -ähnlichen retikulierten Blattphänotyps am Beispiel der <i>A. thaliana</i> Mutanten <i>reticulata</i> und <i>dov1</i>	153
4.4	Die Rolle von NO als Signalmolekül in der <i>cue1</i> -Mutante.....	154
4.5	Die mögliche Funktion von PPT1 in der Wurzel.....	156
5.	Zusammenfassung.....	158
6.	Abkürzungen.....	160
7.	Literaturverzeichnis.....	167
8.	Anhang.....	203
8.1.	Auswahl deregulierter Gene in <i>cue1-1</i> und nach DCG-Fütterung.....	203
8.2.	Gehalte an Cytokininen in der <i>cue1</i> -Mutante und im Wildtyp.....	208
8.3.	Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für das EtOH-induzierbare <i>PPT1</i> RNAi.....	210
8.4.	Auflistung der Gene, deren Expression im Rahmen des „ <i>Activation tagging</i> “ Ansatzes über RT-PCR untersucht wurde.....	211
8.5.	Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.....	211

1. Einleitung

Die Entwicklung der Pflanzen wird vom Keimling bis zur Blütenbildung vielfältig durch Licht gesteuert. Photorezeptoren wie Phytochrome (Quail et al., 1995), Blaulicht/UV-A absorbierende Cryptochrome (Ahmad und Cashmore, 1993) und UV-A/UV-B Rezeptoren (Beggs und Wellman, 1985; Young et al., 1992; Christie und Jenkins, 1996) regulieren die Anpassung der Pflanzen an die Lichtverhältnisse und initiieren die in die Photomorphogenese eingebundenen Stoffwechsel- und Signalwege. In genetischen Ansätzen zur Klärung der komplexen lichtabhängigen Prozesse wurden zu Beginn der 90er Jahre Mutanten gesucht, die durch Störungen in der Lichtperzeption und Signaltransduktion verursachten Veränderungen in der pflanzlichen Photomorphogenese zeigen (Bowler und Chua, 1994; Chory und Susek, 1994; Reed und Chory, 1994).

1.1. Die Isolierung der *Arabidopsis thaliana* *cue*-Mutanten

Zur Untersuchung der lichtabhängigen Regulation kernkodierter Gene mittels genetischer Selektion konnten Mutanten identifiziert werden, bei denen die Expression des lichtregulierten *CAB3* (*Chlorophyll a/b-bindendes Protein 3*) Genes reduziert war (Chory et al., 1993; Chory und Susek, 1994). Die Expression der *CAB* Gene, die einer strengen Kontrolle durch Licht und plastidärer „Signale“ unterliegt, dient als Marker für die Chloroplastenentwicklung. Es konnten neun verschiedene *cue*-Mutanten (*cue* = *chlorophyll a/b binding protein underexpressed*) identifiziert werden, die eine mangelnde De-Repression des *CAB3*-Promotors bei De-Etiolierung zeigen (Li et al., 1995; López-Juez et al., 1998). Die Gene der *CAB* Familie kodieren die Apoproteine der Photosystem II-Antenne (Leutwiler et al., 1986). Die Induktion des *CAB*-Promotors bei Belichtung kann durch mangelnde Transduktion lichtabhängiger Signale oder durch eine Blockade der Plastidenentwicklung gestört werden, die auch die Genexpression im Kern beeinflussen kann (Oelmüller et al., 1986; Mayfield, 1990; Surpin et al., 2002). Auch Faktoren wie der zirkadiane Rhythmus (Millar und Kay, 1996), Hormone (Flores und Tobin, 1986a, b; Bartholomew et al., 1991) und Zuckergehalte (Dijkwel et al., 1997) haben einen Einfluss auf die Expression der *CAB* Gene. Dabei wird von einer starken Interaktion von lichtabhängiger Regulation und der Beeinflussung der *CAB* Expression durch (a) zirkadianen Rhythmus (Wang und Tobin, 1998; Más et al., 2003) oder (b) die

Plastidenentwicklung (Arguello-Astorga und Herrera-Estrella, 1998; López-Juez et al., 1998), letzteres vor allem im Hinblick auf die Funktion des Promotors (Strand, 2004) ausgegangen. Die Interaktion der Kontrolle durch Licht und plastidärer „Signale“ wurde anhand der *cue*-Mutanten *cue3*, *cue6* und *cue8* näher untersucht (Vinti et al., 2005). Hier konnte beobachtet werden, dass plastidäre Signale speziell die Photokontrolle von Genen der Photosynthese beeinflussen und dass die Stärke der Interaktion unabhängig vom Typ des Photorezeptors ist.

Die in dieser Arbeit untersuchte *cue1*-Mutante, die ebenfalls eine gestörte Chloroplastenentwicklung zeigt, kann den CAB-Promotor bei längerer Belichtung ebenfalls nicht dereprimieren (Li et al., 1995). Auch die Transkription weiterer lichtregulierter Proteine wie das plastomkodierte D1-Protein des Photosystems II und die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) ist in den *cue1*-Mutanten gegenüber Kontrollpflanzen verringert (Li et al., 1995). Die gemeinsam über Cryptochrome und Phytochrome vermittelte Expression der Chalkonsynthase (Chory und Peto, 1990) war in *cue1* im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

1.2. Der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutante

Alle der bisher bekannten acht *cue1*-Allele, die über verschiedene Mutagenese-strategien gewonnen werden konnten, zeigen einen retikulierten Blattphänotyp (Abb.1.1) von schwacher bis zur starken Ausprägung, bei dem die leitbündelnahen Bereiche dunkelgrün gefärbt und normal entwickelt sind, während die Mesophyllzellen der Interkostalfelder blassgrün erscheinen und in ihrer Entwicklung gestörte Chloroplasten beinhalten (Li et al., 1995; Streatfield et al., 1999). Die Zellen des Palisadenparenchyms der *cue1*-Mutanten weisen einen höheren Anteil an Interzellularraum auf. Weiterhin besitzen die Mesophyllzellen kleinere Chloroplasten, während die Bündelscheidenzellen in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollpflanzen keine Retardierung der Plastidenentwicklung aufzeigen.

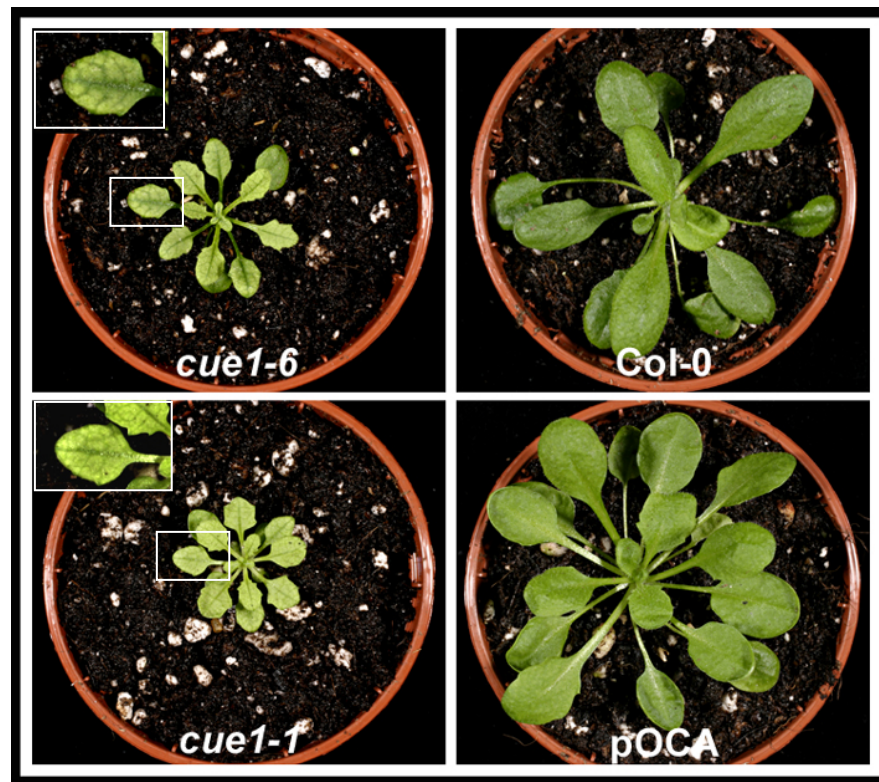


Abb. 1.1 Der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutante am Beispiel der zwei *cue1*-Allele *cue1-1* und *cue1-6* im Vergleich zur Kontrolllinie (pOCA108 (Bensheim) für *cue1-1* und Col-0 für *cue1-6*)

Es gibt weitere Mutanten, deren Plastiden- und Blattmorphologie gestört ist und z. T. *cue1*-ähnliche Wachstumsabnormalitäten aufweisen. Z. B. zeigen die *A. thaliana* Mutanten *dov1* (*differential development of vascular associated cells*; Kinsman und Pyke, 1998) und *reticulata* (Rédei und Hirono, 1964) bzw. *lcd1-1* (Barth und Conklin, 2003) einen *cue1*-ähnlichen Phänotyp, weisen aber keinen Defekt in der *CAB*-Expression auf. Die aberrante Blattmorphologie in den *dov1*-Mutanten wird durch eine Störung der Chloroplastenentwicklung im Mesophyll hervorgerufen, die Anzahl der Chloroplasten pro Zelle ist in diesem Gewebe im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50% reduziert. Die aufgrund ihrer Ozon-Sensitivität entdeckte *lcd1-1* (*lower cell density*) Mutante (Barth und Conklin, 2003) besitzt eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Zelldichte im Palisadenparenchym. Durch den Funktionsverlust des *LCD1* Gens weisen die Mutanten einen geringeren Chlorophyllgehalt auf, der die betroffenen Bereiche der Pflanze heller erscheinen lässt. Ein retikulierter *cue1*-ähnlicher Phänotyp konnte auch in transgenen Tabak-Pflanzen beobachtet werden, in denen die Funktionalität der endogenen MYB-

Transkriptionsfaktoren durch Überexpression von heterologen *MYB*-Genen aus *Antirrhinum majus* eingeschränkt ist (Tamagnone et al., 1998a). Durch die Blockade der Bindungsstellen für die endogenen MYB-Faktoren an den Promotoren kommt es in diesen Transformanten zu einer transkriptionellen Repression einiger Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels. Dadurch weisen die transgenen Pflanzen weniger Lignin und reduzierte Gehalte weiterer Sekundärmetabolite auf.

1.3 Die Mutation in *cue1* resultiert in einen Funktionsverlust eines Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran

Nach weiteren Untersuchungen der *cue1*-Mutanten wurde überraschenderweise festgestellt, dass das in *cue1* betroffene Gen für einen Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren plastidären Hüllmembran kodierte (Streatfield et al., 1999). Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (Fischer et al., 1997) gehört zur Familie der Phosphat-Translokatoren (PTs) der inneren Chloroplastenmembran, die aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Klassen eingeteilt werden können. Die weiteren drei Mitglieder der Phosphat-Translokator-Familie sind der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (Flügge et al., 1989), der Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (Kammerer et al., 1998) und der Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (Eicks et al., 2002). Die PTs besitzen innerhalb einer Klasse eine Aminosäure-Identität von 75-85%, während zwischen den Klassen die Ähnlichkeit 30-45% beträgt (Kammerer et al., 1998; Eicks et al., 2002; Knappe et al., 2003). Für die Phosphat-Translokatoren werden sechs bis acht Transmembrandomänen vorhergesagt. Alle PTs sind kernkodiert und tragen eine plastidenspezifische N-terminale Transitsequenz (Flügge, 1999).

1.3.1. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran

Nach heutigen Erkenntnissen fehlt den meisten Chloroplasten und einigen nichtgrünen Plastiden die enzymatische Ausstattung für die Generierung von Phosphoenolpyruvat

(PEP) aus 3-Phosphoglycerat (3-PGA) (Stitt und ap Rees, 1979; Schulze-Siebert et al., 1984; Journet und Douce, 1985; Bagge und Larsson, 1986; Van der Straeten et al., 1991; Miernyk und Dennis, 1992; Borchert et al., 1993). Bisher konnten nur in fettspeichernden Plastiden ausreichende Enzymaktivitäten der Phosphoglyceratmutase und der Enolase für eine vollständige Glykolyse nachgewiesen werden (Dennis und Miernyk, 1982; Kang und Rawsthorne, 1994). Die Pyruvat, P_a -Dikinase (PPDK) katalysiert die ATP-abhängige Generierung von PEP aus Pyruvat (Carrol et al., 1994) und stellt eine weitere Möglichkeit dar, Plastiden mit PEP zu versorgen. Allerdings ist die PPDK-Aktivität in C_3 -Pflanzen sehr gering (Ishimaru et al., 1997, 1998), so dass ihr bisher nur eine untergeordnete Rolle bei der Bereitstellung von PEP zugewiesen wurde. Über die PEP-Carboxykinase (PEPCK) kann ebenfalls Phosphoenolpyruvat (PEP) in Pflanzen generiert werden. PEPCK katalysiert die ATP-abhängige Decarboxylierung von Oxalacetat (OAA) zu PEP im Cytosol (Walker et al., 1999). Sie ist in die Glukoneogenese während der Samenbeladung, während der Fruchtreife und in die Mobilisierung von Speicherfetten während der Samenkeimung eingebunden (Walker et al., 1999; Bahrami et al., 2001) und in C_3 -Pflanzen in höherer Aktivität nur in reproduktivem Gewebe und in Trichomen zu finden (Walker et al., 1999; Chen et al., 2000). PEPCK ist ein cytosolisches Enzym und hat daher keine Funktion für die Generierung von PEP in den Plastiden.

Das Vorhandensein von PEP im Stroma ist jedoch notwendig für verschiedene Stoffwechselvorgänge wie den Shikimatweg, der zur Synthese von aromatischen Aminosäuren und einer großen Anzahl an Sekundärmetaboliten führt (Herrmann und Weaver, 1999). Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT), der PEP in die Plastiden importiert, stellt somit eine wichtige Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze dar (Fischer et al., 1997). Transportstudien, die zuerst anhand des PPT aus Blumenkohlinfloreszenzen durchgeführt wurden, führten zu dem Ergebnis, dass der BoPPT den Gegentauch von PEP, 2-PGA und anorganischem Phosphat katalysiert, jedoch unter physiologischen Bedingungen nur der Gegentauch von PEP und P_a eine Rolle zu spielen scheint (Fischer et al., 1997).

Neben der Funktion als Vorstufe für den Shikimatweg, geht PEP außerdem über Pyruvat in die Fettsäurebiosynthese (Kleinig und Liedvogel, 1980; Qi et al., 1994) und in die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren (Schulze-Siebert et al., 1984; Singh und Shaner, 1995) ein.

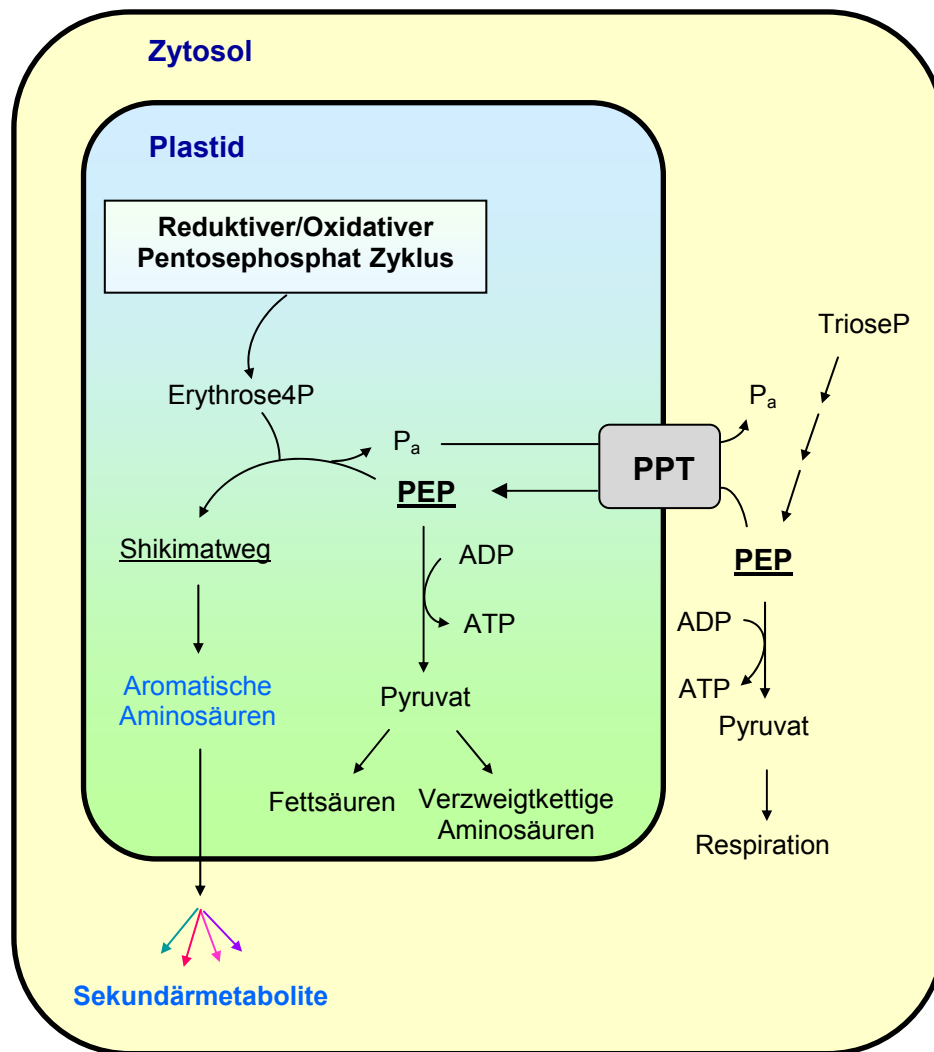


Abb. 1.2 Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran

In *A. thaliana* wurde neben dem PPT1, der in der *cue1*-Mutante defekt ist, ein zweiter Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator, PPT2, entdeckt. AtPPT1 und AtPPT2 haben nur eine Ähnlichkeit von 52% auf Aminosäureebene und sind in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Durch Promotor-GUS- und Promotor-GFP-Fusionen konnte gezeigt werden, dass der AtPPT1-Promotor im Leitgewebe von Blättern, Blüten und Wurzeln, vor allem in den Xylemparenchymzellen, aktiv ist (Knappe et al., 2003). Der AtPPT2-Promotor ist dagegen in grünen Geweben und Blüten ubiquitär und in Wurzeln und Samen nicht aktiv. Die Substratspezifitäten der beiden PPTs aus *A. thaliana* wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.3.2. Die Funktionen weiterer Mitglieder der Phosphat-Translokator-Familie

Nachfolgend werden auch die Funktionen der anderen drei Mitglieder der Phosphat-Translokator-Familie kurz beschrieben:

1.3.2.1 Der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT)

Der TPT wurde als erster plastidärer Phosphat-Translokator molekular charakterisiert (Flügge et al., 1989). Dieser PT ist ausschließlich in grünen Geweben exprimiert (Schulz et al., 1993) und ist das dominierende Protein der inneren plastidären Hüllmembran (Flügge et al., 1991). Der TPT vermittelt den Export der im Verlauf der photosynthetischen CO₂-Assimilation gebildeten Triosephosphate aus den Chloroplasten ins Cytosol (Fliege et al., 1978; Flügge et al., 1989; Flügge, 1999). Dort dienen die Triosephosphate der Bildung von Saccharose und Aminosäuren. Als Gegentauchsubstrate kommen unter physiologischen Bedingungen P_a oder 3-Phosphoglycerat (3-PGA) in Frage, durch die die Phosphatbilanz der Chloroplasten ausgeglichen wird. Durch Antisense-Experimente in Kartoffel (Riesmeier et al., 1993; Heineke et al., 1994) und Tabak (Häusler et al., 1998, 2000) wurde die Rolle des TPT im photosynthetischen Kohlenstoffmetabolismus untersucht. Zudem konnte eine *knock-out* Mutante für TPT aus *A. thaliana* charakterisiert werden (Schneider et al., 2002).

1.3.2.4 Der Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT)

Mit dem GPT wurde von Kammerer et al. (1998) ein weiteres Mitglied der Phosphat-Translokator-Familie identifiziert, welches den Hexosephosphattransport katalysiert. Hierbei wird cytosolisches Glk6P gegen plastidäres P_a getauscht. Andere Hexosephosphate wie Glk1P und Frk6P werden so gut wie nicht transportiert (Kammerer et al., 1998), wohingegen Triosephosphate und 3-PGA als weitere Substrate für GPT akzeptiert werden. Eine Untersuchung des Expressionsmusters des GPT ergab, dass die Expression hauptsächlich auf heterotrophe Gewebe wie z. B. Kartoffelknollen beschränkt ist (Kammerer et al., 1998). Als *in vivo*-Funktion für den GPT wurde die Versorgung von

nicht grünen Plastiden mit Hexosephosphaten für die Stärkesynthese und den OPPP postuliert.

A. thaliana besitzt zwei *GPT*-Gene, *AtGPT1* und *AtGPT2*, mit einer 74%igen Identität auf Aminosäure-Ebene. Beide Translokatoren können Glk6P transportieren (Knappe, 2002). Während *AtGPT1* in allen Pflanzenorganen exprimiert ist, ist die Expression von *AtGPT2* auf wenige Gewebe beschränkt und in höherer Menge nur in Kelchblättern und seneszenten Blättern zu finden (Knappe, 2002). Die Analyse von T-DNA Insertionsmutanten zeigte für *gpt2* keine Beeinträchtigung des Wachstums und der Entwicklung der Mutanten, wohingegen die Mutationen des *GPT1* (*gpt1-1* und *gpt1-2*) letal waren. Als Ursache für die *gpt1* Letalität wurde eine durch die Unterbrechung der *GPT1* Funktion hervorgerufene Störung der gametophytischen Entwicklung postuliert (Niewiadowski et al., 2005).

1.3.2.5 Der Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (XPT)

Der in allen Geweben exprimierte XPT wurde durch Eicks et al. (2002) charakterisiert. Der XPT besitzt eine dem GPT ähnliche Substratspezifität, transportiert jedoch unter physiologischen Bedingungen Xylulose 5-Phosphat statt Glk6P. Dem XPT wird eine Rolle in der Kooperation zwischen den cytosolischen und plastidären Pentosephosphatwegen zugeschrieben (Eicks et al., 2002). Diese besteht darin, die plastidären Pentosephosphatwege mit Endprodukten des cytosolischen OPPP aufzufüllen, wenn ein erhöhter Bedarf an Intermediaten besteht. Die Analyse der *A. thaliana knock-out* Mutante des Translokators (*xpt-1*) zeigte keine wesentlichen Einschränkungen der pflanzlichen Funktionen (Eicks, 2004).

1.4. Der PPT und seine Bedeutung für den Primär- und Sekundärstoffwechsel

1.4.1. PEP als Vorstufe für aromatische Aminosäuren

Im Stroma stellt PEP, zusammen mit Erythrose-4-Phosphat aus dem Calvin-Zyklus bzw. dem OPPP, die Vorstufe für den Shikimatweg dar, aus dem sich aromatische Aminosäuren und eine Reihe weiterer wichtiger Primär- und Sekundärmetabolite ableiten (Herrmann,

1995; Henkes et al., 2001). Der Fluß über den Shikimatweg läuft bis zur Stufe des Chorismats ausschließlich im Stroma ab (Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann, 1995; Herrmann und Weaver, 1999). Somit muss eine ausreichende Versorgung von Plastiden mit PEP gewährleistet sein, um die von der Pflanze benötigten aromatischen Aminosäuren für die Generierung essentieller Sekundärmetabolite bereitzustellen.

Bei der Synthese von 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (Anderson et al., 1990) geht PEP nochmals in den Shikimatweg ein. Diese Reaktion wird durch die EPSP (5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat)-Synthase katalysiert, die durch Glyphosat, welches als Herbizid eingesetzt wird (Round-up®, Monsanto), gehemmt werden kann. Die über Chorismat gebildeten aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) (Schmid und Amrhein, 1995) stellen neben ihrer Funktion als proteinogene Aminosäuren die Vorstufen für eine Reihe von verschiedenen Sekundärmetaboliten dar. Die Synthese von Phe und Tyr, die durch Produktinhibitionsmechanismen kontrolliert wird (Byng et al., 1981; Siehl und Conn, 1988; Schmid und Amrhein, 1995), beginnt mit der Bildung von Prephenat aus Chorismat durch die Chorismatmutase. Nach anschließender Transaminierung wird Arogenat gebildet, die gemeinsame Vorstufe von Phe und Tyr.

Die Tryptophan-Biosynthese wird durch die Anthranilat-Synthase eingeleitet, deren enzymatische Aktivität durch Trp inhibiert werden kann und eine Schlüsselrolle in der Regulation der Trp-Synthese spielt (Belser et al., 1971; Niyogi und Fink, 1992; Radwanski und Last, 1995). In *A. thaliana trp5*-Mutanten, die eine um 50% reduzierte Aktivität der Anthranilat-Synthase aufweisen, ist die Konzentration an freiem Trp dreimal so hoch wie im Wildtyp (Li und Last, 1996).

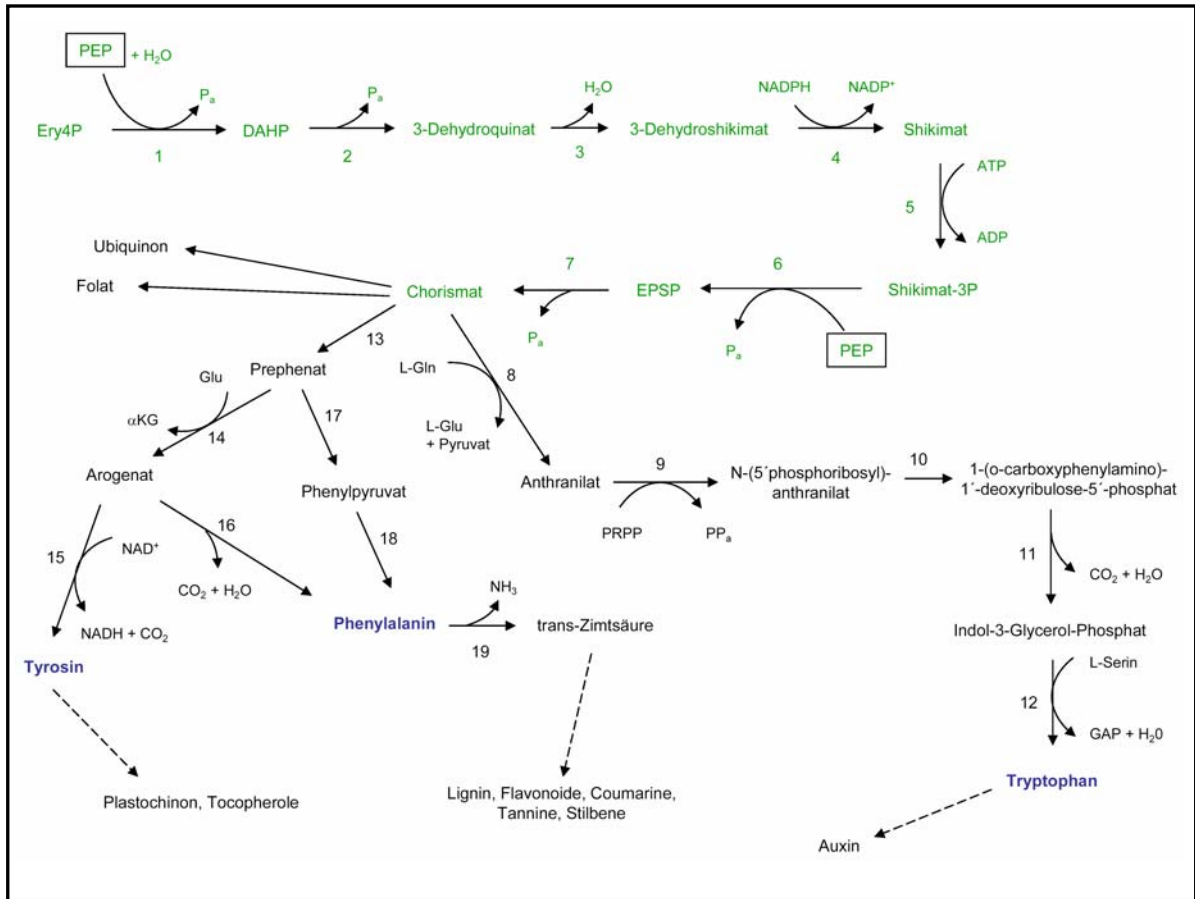


Abb. 1.3: Über den Shikimatweg werden aromatische Aminosäuren synthetisiert.

DAHP: 3-deoxy-D-*arabino*-heptulose-7-phosphat; EPSP: 5-*enol*pyruvylshikimat-3-phosphat

Die Enzyme: 1. DAHP-Synthase; 2. 3-Dehydroquinate-Synthase; 3. 3-Dehydroquinate-Dehydratase; 4. Shikimat-NADP-Oxidoreduktase; 5. Shikimatkinase; 6. EPSP-Synthase; 7. Chorismat-Synthase; 8. Anthranilat-Synthase; 9. Anthranilat-Phosphoribosyltransferase; 10. Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase; 11. Indol-3-Glycerol-Phosphat-Synthase; 12. Tryptophan-Synthase; 13. Chorismat-Mutase; 14. Prephenat-Aminotransferase; 15. Arogenat-Dehydrogenase; 16. Arogenat-Dehydratase; 17. Prephenat-Dehydratase; 18. Phenylpyruvat-Aminotransferase; 19. Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)

1.4.2 Die Synthese von Sekundärmetaboliten aus aromatischen Aminosäuren

1.4.2.1 Die Synthese von Phenylpropanen und ihre Regulation

Die Funktionen von Sekundärmetaboliten in der Pflanze sind divers. Sie können als UV-Schutzsubstanzen (Sheahan, 1996; Bieza und Lois, 2001), Festigungssubstanzen (Lewis und Yamamoto, 1990), Phytoalexinen (Tsuji et al., 1992; Hammerschmidt, 1999), Antioxidantien (Yamasaki et al., 1996, 1997; Grace und Logan, 2000; Gould et al., 2002)

und Botenstoffen (Tamagnone et al., 1998a, b) fungieren und in der Signalmodulation involviert sein (Jacobs und Rubery, 1988; Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001).

Phenylpropane stellen eine wichtige Gruppe von Sekundärmetaboliten dar, die in verschiedenen Stoffwechselwegen wie Pflanzenwachstum, Abwehr und Signaltransduktion eingebunden (Dixon und Paiva, 1995) und in allen Pflanzenorganen von Bedeutung sind.

Die aus Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) gebildete Zimtsäure ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Phenylpropanen und deren Polymerisierungsprodukten wie Monolignole (Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999; Li et al., 2000, 2001; Humphreys und Chapple, 2002), Lignin (Bao et al., 1993) und hydrolysierbare Tannine (Koornneef, 1990). Aktivierte Zimtsäurederivate, CinnamoylCoA-Thioester, stellen gemeinsam mit MalonylCoA-Bausteinen den Ausgangspunkt für die Synthese von Flavonoiden, Coumarinen und kondensierten Tanninen dar (Hahlbrock und Grisebach, 1979; Hahlbrock und Scheel, 1989; Graham, 1998). Die PAL ist eines der bestuntersuchten Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und unterliegt einem strengen Regulationsmechanismus. In Pflanzen mit veränderter PAL-Aktivität wird eine Rückkopplungskontrolle durch die Endprodukte aus dem Phenylpropanstoffwechsel beobachtet (Elkind et al., 1990; Bate et al., 1994). In *A. thaliana* (Ohl et al., 1990; Wanner et al., 1995; Cochrane et al., 2004) und anderen Pflanzenarten (Minami et al., 1989; Cramer et al., 1989; Lois et al., 1989; Kawamata et al., 1992; Yamada et al., 1992; Lee et al., 1992; Subramaniam et al., 1993; Appert et al., 1994; Sakurai et al., 2001; Kao et al., 2002; Campos et al., 2004) existieren mehrere PAL-Isoformen. Diese könnten Multienzymkomplexe ansteuern (Winkel-Shirley, 1999), deren enzymatische Aktivitäten durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Äußere Einflüsse wie Verwundung, Pathogeninfektionen und UV-Stress sowie entwicklungsspezifische Faktoren können die Expression einiger PAL-Gene induzieren (Lois et al., 1989; Liang et al., 1989; Ohl et al., 1990; Yamada et al., 1992; Shufflebottom et al., 1993; Dailianas et al., 1994; Hatton et al., 1995; Campos et al., 2004). Eine Anreicherung von Anthocyanen kann z. B. durch abiotischen Stress hervorgerufen werden (Christie et al., 1994; Piao et al., 2001; Li und Strid, 2005). Die Akkumulation dieser Phenylpropane wird auch durch UV- und Blaulicht (Fuglevand et al., 1996; Lin et al., 1996) sowie Rotlicht (Chory und Peto, 1990; Barnes et al., 1996) induziert.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Signalmolekül in Pflanzen. NO-gesteuerte Signalwege können regulatorisch in den Phenylpropanoidmetabolismus eingreifen und dadurch z. B. Einfluss auf die Pathogenabwehr nehmen (Zeier et al., 2004). In

Hypokotylen der Sojabohne wurde eine NO-vermittelte Akkumulation von Phytoalexinen festgestellt (Modolo et al., 2002). Weiterhin scheint NO als Signalmolekül innerhalb der Ligninbiosynthese zu wirken (Ros Barceló et al., 2002; Gabaldón et al., 2005).

1.4.2.2 Weitere aus aromatischen Aminosäuren abgeleitete Sekundärmetabolite

Außerhalb des Phenylpropanstoffwechsels ist die von Tyrosin ausgehende Plastochinon-Biosynthese ein wichtiger dem Shikimatweg nachgeschalteter Stoffwechselweg (Garcia et al., 1999). Plastochinon ist der Redoxakzeptor des PSII und spielt auch eine Rolle als Elektronenakzeptor bei der von der Phytoen-Desaturase katalysierten Reaktion bei der Biosynthese von Carotinoiden (Norris et al., 1995). Mit der Tyrosin-Aminotransferase (TAT) katalysierten Transaminierung von Tyrosin zu p-Hydroxyphenylpyruvat beginnt auch der Stoffwechselweg zur Synthese von Tocopherolen, einer weiteren Gruppe pflanzlicher Antioxidantien (Sandorf und Holländer-Czytko, 2002; Holländer-Czytko et al., 2005).

Als Vorstufe verschiedener sekundärer Metabolite wie Indol-Glucosinolate und Camalexin hat Tryptophan eine kontrollierende Wirkung auf die Synthese der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. In Tryptophan akkumulierenden Pflanzenlinien wurden erhöhte Gehalte an Phenylalanin und Tyrosin, aber ein Rückgang in der Synthese von Flavonoiden und anderen Phenylpropanen ermittelt (Ishihara et al., 2006). Tryptophan kann als Vorstufe für die Synthese des Phytohormones Auxin (Indolelessigsäure, IAA) dienen. Dabei werden mehrere Synthesewege zur Generierung von IAA aus Tryptophan postuliert (Pollmann et al., 2006).

Aromatische Aminosäuren können auch als Vorstufen in die Synthese von Alkaloiden eingehen. Dabei handelt es sich um eine große Gruppe von Sekundärmetaboliten, die häufig eine ausgeprägte pharmakologische Wirkung haben (Kutchan, 1995; De Luca und Laflamme, 2001; Facchini, 2001). Viele Alkaloide dienen der Pflanze zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen und Herbivoren (Caporale, 1995; Wink, 1999).

1.4.2.3 Die Funktionen der Phenylpropane

Als einfache Phenylpropane gehen Monolignole (Costa et al., 2003) wie die Cinnamyl-Alkohole p-Coumarylalkohol, Sinapylalkohol und Coniferylalkohol in die Synthese von Gerüstsubstanzen wie Lignin und Suberin ein (Holloway, 1983; Lewis und Yamamoto, 1990). Neben Flavonolen wie Kaempferol und Quercetin, spielen einfache Phenylpropane wie Sinapin (Sinapoylcholin), Sinapoylmalat oder Sinapoylglukose eine wichtige Rolle bei der Absorption schädlicher UV-B-Strahlen in *A. thaliana* (Chapple et al., 1992; Lois und Buchanan, 1994; Sheahan, 1996).

Phenylpropane können auch als Antioxidantien wirken. Die unter oxidativem Stress vermehrt synthetisierte Chlorogensäure (Grace und Logan, 2000), ein Kondensat aus Chinon und Kaffesäure, macht in *Mahonia repens* mehr als 90% des Phenylpropangehaltes aus (Grace et al., 1998) und kann auch in vielen Pflanzenarten wie Tabak (Maher et al., 1994; Shadle et al., 2003), Kartoffel (Yao et al., 1995) und Paprika (Diaz et al., 1997) als ein effektives Antioxidans wirken. In *A. thaliana* werden Anthocyanen (Yamasaki et al., 1996; Piao et al., 2001) und Kaempferol- und Quercetin-Aglyka (Yamasaki et al., 1997) antioxidative Fähigkeiten zugeschrieben.

Die Abwehr von Pathogenen wie Viren, Pilze, Bakterien und Fraßfeinde gehört ebenfalls zum breiten Funktionsspektrum der Phenylpropane. Quercetin und Quercetinderivate (French et al., 1991; French und Towers, 1992; Rusak et al., 1997) dienen in Solanaceen dem Schutz vor Vireninfectionen, indem sie die für die Infektion notwendige virale Reverse Transkriptase hemmen (Spedding et al., 1989; Ono et al., 1990).

Phenylpropane sind als Phytoalexine (Hammerschmidt, 1999) in die Abwehr pilzlicher Pathogene involviert. Dazu gehören u. a. Coumarine wie Scopoletin (Tal und Robeson, 1986), Stilbene wie Resveratrol (Langcake und Pryce, 1976; Jeandet et al., 1995; Ragab et al., 2006), und Isoflavone, z. B. Pisatin (Wu et al., 1997). Bei der Etablierung der systemischen Antwort der Pflanze auf das Pathogen (*systemic acquired resistance, SAR*) sind Flavonoide beteiligt (Graham et al., 1995). Die aus dem Phenylpropanstoffwechsel abgeleiteten Phytoalexine scheinen in *A. thaliana* allerdings keine Rolle zu spielen (Hagemeier et al., 2001). In die Abwehr von Fraßfeinden können Flavonoide wie Quercetin, Isorhamnetin und Hesperidin involviert sein (Lattanzio et al., 2000; Tringali et al., 2001).

1.4.2.4 Phenylpropane modulieren Signalwege

Phenylpropane spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und können auf vielfältige Weise in die Signalwege von Phytohormonen wie Auxin und Cytokinin eingreifen.

1.4.2.4.1 Auxin

Auxin (Indolessigsäure, IAA) greift kontrollierend in verschiedene Bereiche der Pflanzenentwicklung wie Apikaldominanz (Chatfield et al., 2000), Streckungswachstum (Sánchez-Bravo et al., 1992), Tropismen (Jensen et al., 1998; Rashotte et al., 2000) und die Entwicklung von Blättern (Sieburth, 1999; Reinhardt et al., 2000; Ljung et al., 2001; Mattsson et al., 2003; Keller et al., 2004) und Wurzeln (Reed et al., 1998; Muday und DeLong, 2001; Casimiro et al., 2003; Friml, 2003; Grebe, 2004; Ljung et al., 2005) ein.

Auxin wird hauptsächlich im Apikalmeristem synthetisiert und durch polaren Transport von Zelle zu Zelle (Lomax et al., 1995) sowie in der Wurzel akropetal zur Wurzelspitze (Muday und DeLong, 2001; Friml, 2003) transportiert. In der Wurzelspitze akkumulierendes IAA kann allerdings auch basipetal entlang der Streckungs- und Differenzierungszone transportiert werden, um dort in Entwicklungsprozesse wie Streckungswachstum, Gravitropismus und Initiation des Lateralwurzelswachstums einzugehen (Rashotte et al., 2000; Casimiro et al., 2001; Swarup et al., 2001; Bhalerao et al., 2002; Ottensschläger et al., 2003). Der Transport von IAA wird über Influx- und Effluxtransporter des polaren Auxintransportsystems (PAT) vermittelt (Swarup et al., 2001; Friml et al., 2002a, b; Benková et al., 2003). Als Produkte des Phenylpropanstoffwechsels können Flavonoide regulierend auf Auxin-Effluxtransporter einwirken (Jacobs und Rubery, 1988; Peer et al., 2004). Durch Untersuchungen der im Auxintransport eingebundenen *PIN* (*pin-formed*) Auxin-Effluxproteine (Geldner et al., 2001, 2003; Benková et al., 2003; Noh et al., 2003; Blakeslee et al., 2004), konnten Interaktionen von Flavonoiden mit Proteinen der *PIN*-Familie festgestellt werden (Peer et al., 2004). Quercetin und Kaempferol sind in keimenden *A. thaliana* Pflanzen vor allem im Hypokotyl und in der Wurzelspitze zu finden (Peer et al., 2001; Murphy et al., 2000). In *A. thaliana transparent testa4* (*tt4*)-Mutanten, die aufgrund eines Defektes der Chalkonsynthase keine Flavonoide mehr bilden können (Shirley et al., 1995), wurden

höhere Auxintransportraten festgestellt, die durch Behandlung mit NPA (1-Naphthylphthalaminsäure) als Auxin-Efflux-Inhibitor oder Naringenin als Produkt der Flavonoidbiosynthese wieder revertiert werden konnten (Murphy et al., 2000, Brown et al., 2001).

1.4.2.4.2 Cytokinin

Cytokinine spielen eine große Rolle beim Wachstum und der Entwicklung der Pflanze und sind in Prozessen wie Zellteilung, Seneszenz, Stressantwort, Pathogenabwehr sowie in lichtregulierte Prozesse wie De-Etiolierung und Chloroplastenentwicklung (Mok, 1994; Schmülling, 2004) involviert. Cytokinine sind N⁶-substituierte Adeninderivate, die sich durch die strukturellen Modifizierungen der Seitenkette an der N⁶-Position in Funktion, Aktivität, Stabilität und Transport unterscheiden (Letham und Palni, 1983; Koshimizu und Iwamura, 1986; Jameson, 1994; Mok und Martin, 1994; McGaw und Burch, 1995; Auer, 1997; Chen, 1997; Mok und Mok, 2001). Viele der in der Biosynthese und im Abbau der Cytokinine beteiligten Enzyme, wie die als Schlüsselenzym in der Cytokinin-Biosynthese fungierende Isopentenyltransferase (Takei et al., 2001; Kakimoto, 2001, 2003) wurden untersucht (Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999; Martin et al., 1999a, b, 2001), doch ihre Regulation ist noch nicht vollständig geklärt. Die Wirkung von Cytokinin wird oft durch ihre Interaktion mit anderen Hormonen maskiert. Sie können z. B. synergistisch oder antagonistisch mit Auxin interagieren (Coenen und Lomax, 1997; Hartig und Beck, 2006) und in die Synthese von Ethylen regulierend eingreifen (Cary et al., 1995). Es ist daher sehr schwierig, die Wirkung von Cytokinin klar zu definieren und z. B. phänotypische Änderungen der Pflanze einem bestimmten Cytokinin-spezifischen Effekt zuzuordnen (Binns, 1994; Deikman, 1997; Vogel et al., 1998; Faure und Howell, 1999).

Um Informationen darüber zu bekommen, wie und in welche Prozesse Cytokinine kontrollierend eingreifen können, wurden Untersuchungen von *A. thaliana* Cytokinin-defizienten Mutanten, die durch Überexpression der *Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase* (*CKX*) generiert wurden, durchgeführt (Werner et al., 2001, 2003, 2006). Dabei zeigte sich, dass eine zentrale Funktion der Cytokinine in der Kontrolle der Zellproliferation des Meristems, und zwar in Blatt- und Wurzel auf gegensätzliche Weise, zu finden ist. Untersuchungen anhand der Mitglieder der *AtCKX* Genfamilie zeigten Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften, der subzellulären Kompartimentierung und der Regulation

der Expression der einzelnen Gene auf (Werner et al., 2003). Weitere Analysen zur Klärung der Signalaufnahme und -transduktion von Cytokinin wurden durchgeführt (Hutchinson und Kieber, 2002; Heyl und Schmölling, 2003). Dabei sind Cytokininrezeptoren wie *CRE1* (*Cytokinin response 1*)/*AHK4* (*Arabidopsis histidine kinase 4*) (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001), *AHK2*, *AHK3* sowie *AHPs* (*Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins*) und *ARRs* (*Arabidopsis response regulators*) (Brandstatter und Kieber, 1998; Taniguchi et al., 1998) involviert. Analysen zur Identifizierung von Cytokinin-sensitiven Prozessen lassen die Existenz von Transkriptionskaskaden vermuten, durch die Cytokinine wirken und Signalwege modulieren (Brenner et al., 2005).

Als Derivat aus dem Phenylpropanstoffwechsel ist Dehydrodiconiferylalkohol-Glukosid (DCG) als Bestandteil des Cytokinin-Signalwegs diskutiert worden (Teutonico et al., 1991). Zuerst aus *Vinca rosea* Tumorzellen isoliert (Wood et al., 1974), weist DCG in Tabak wachstumsfördernde Aktivitäten auf (Binns et al., 1987; Lynn et al., 1987). Die Gehalte der DCG Enantiomere A und B sind nach Cytokininbehandlung um etwa das hundertfache höher als in ruhenden Geweben (Binns et al., 1987). Durch Herauslösen als vorgeformte Dimere aus der Zellwand, in die Phenylpropanoide in Form von Lignin eingelagert sind (Fry, 1986; Hahlbrock und Scheel, 1989), könnten die DCGs A und B synthetisiert werden. Wahrscheinlicher ist jedoch eine direkte Synthese aus Coniferyl-Alkohol (Orr und Lynn, 1992).

Tabakpflanzen, die MYB-Transkriptionsfaktoren aus *Antirrhinum majus* überexprimieren, weisen reduzierte Lignin-Gehalte auf, da die Bindestellen der in der Lignin-Biosynthese involvierten MYB-Transkriptionsfaktoren durch die Überexpression der MYB-Faktoren blockiert wurden (Tamagnone et al., 1998a, b). Durch Supplementierung von DCGs konnten der retikulierte Phänotyp und Wachstumsabnormalitäten, wie sie auch in den *A. thaliana cue1*-Mutanten zu finden sind, revertiert werden (Li et al., 1995; Tamagnone et al., 1998a, b; Streatfield et al., 1999).

1.4.3 Die Rolle von PEP bei der Synthese von Fettsäuren und verzweigtkettigen Aminosäuren

1.4.3.1. PEP als Vorstufe für die Synthese von Fettsäuren

In Pflanzen werden Fettsäuren in den Plastiden synthetisiert (Ohlrogge et al., 1979; Ohlrogge und Jaworski, 1997), dann exportiert und am Endoplasmatischen Reticulum (ER) modifiziert (Moore, 1993).

Die plastidäre Fettsäurebiosynthese in heterotrophen Geweben ist abhängig von der Versorgung mit Kohlenstoffgerüsten aus dem Cytosol. Das zur Generierung von Malonyl-CoA benötigte Acetyl-CoA muss über Vorstufen innerhalb des Plastiden bereitgestellt werden. Dabei variiert die Menge an angelieferten Metaboliten wie Glukose-6-Phosphat, Triosephosphat, Malat und Pyruvat (Smith et al., 1992; Kang und Rawsthorne, 1994; Qi et al., 1995; Eastmond und Rawsthorne, 2000). Auch PEP ist in der Lage, die plastidäre Fettsäuresynthese anzutreiben. Untersuchungen an Embryos aus Raps (*Brassica napus*), der wie *A. thaliana* zur Familie der Brassicaceen gehört, konnten zeigen, dass hauptsächlich PEP als Kohlenstoffquelle für die plastidäre Fettsäuresynthese dient (Schwender und Ohlrogge, 2002; Schwender et al., 2003). Somit kann der ausreichenden Versorgung des Plastiden mit PEP eine wichtige Rolle beim störungsfreien Ablauf der plastidären Fettsäurebiosynthese zugeordnet werden (Kubis et al., 2004). Nach dem Import von PEP ins Stroma stehen nach der Umsetzung von PEP über die plastidäre Pyruvatkinase sowohl Pyruvat für den plastidären Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Reid et al., 1977; Elias und Givan, 1979; Lernmark und Gardeström, 1994) als auch ATP zur Verfügung. Die Versorgung mit ATP für die Fettsäuresynthese wurde in isolierten nicht-grünen Plastiden in verschiedenen Pflanzen und Geweben untersucht (Kleinig und Liedvogel, 1980; Boyle et al., 1990; Qi et al., 1994). Die für die Synthese von Fettsäuren benötigten Reduktionsäquivalente in Form von NADPH und NADH (Slabas und Fawcett, 1992), können durch den Umsatz von Hexosephosphaten im OPPP (Dennis, 1989; Kang und Rawsthorne, 1996; Eastmond und Rawsthorne, 2000; Schwender et al., 2003) und durch die Synthese von Acetyl-CoA aus Glc6P, Malat oder Pyruvat (Smith et al., 1992; Kang und Rawthorne, 1996) bereitgestellt werden.

In autotrophen Geweben von C₃-Pflanzen wird das Pyruvat für die plastidäre Fettsäuresynthese durch einen direkten Import von Pyruvat (Proudlove und Thurman, 1981) oder über die oxidative Spaltung importierten Malats über das NADP-Malatenzym

angeliefert (Edwards und Andreo, 1992; Drincovich et al., 1998). Die für die Fettsäuresynthese benötigten Reduktionsäquivalenten und ATP werden über die Photophosphorylierung in der Lichtreaktion bereitgestellt.

1.4.3.2. PEP als Vorstufe für die Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren

PEP kann über die Bereitstellung von Pyruvat zur Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren beitragen, die im Stroma der Plastiden erfolgt (Schulze-Siebert et al., 1984; Kaneko et al., 1990; Sathasivan et al., 1990; Frisch et al., 1991; Weisemann und Matthews, 1993; Ghislain et al., 1994; Muehlbauer et al., 1994). Pyruvat, welches über die oxidative Malatspaltung durch das NADP-Malatenzym aus Malat oder die plastidäre Pyruvatkinase aus PEP gebildet werden kann, dient als Vorstufe für die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin und Valin aus Acetolactat (Bonner und Jensen, 1997). Pyruvat kann aber auch direkt in die Plastiden importiert werden (Proudlove und Thurman, 1981). Das aus Threonin durch eine Desaminase hergestellte α -Ketobutyrat bildet die Vorstufe für die verzweigtkettige Aminosäure Isoleucin (Samach et al., 1995).

Die Synthesen von Leucin, Valin und Isoleucin unterliegen nicht nur einer Kontrolle durch die Endprodukte, denn die Bildung von Isoleucin wird zusätzlich durch komplexe Regulationsmechanismen von Aminosäuren der Aspartatfamilie beeinflusst (Galili, 1995). Die Synthese der von Aspartat abgeleiteten Aminosäuren Methionin, Lysin und Threonin unterliegt ebenfalls einer starken Rückkopplungskontrolle durch die Endprodukte. Zudem können Lysin und das aus Methionin abgeleitete S-Adenosylmethionin regulatorisch antagonistisch zu Threonin – und den Threonin nachgeschalteten verzweigtkettigen Aminosäuren wirken (Rognes et al., 1980; Galili, 1995). Pyruvat geht auch in die Biosynthese von Lysin ein (Galili, 1995). Somit wirkt die Bereitstellung des gemeinsamen Substrates Pyruvat im Plastiden synergistisch auf den gesamten Stoffwechselkomplex und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese von Aminosäuren der Pyruvat- und Aspartatfamilie.

1.4.4. Die Rolle von PEP in der Bereitstellung von Pyruvat für den plastidären Methylerythritol-Phosphat (MEP)-Stoffwechsel

Als Vorstufe für den plastidären Methylerythritol-Phosphat (MEP)-Stoffwechsel muss Pyruvat über die Generierung aus PEP im Plastiden bereitgestellt oder direkt importiert werden. Pyruvat bildet zusammen mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat die Ausgangssubstanzen für die Isomere Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), die Vorstufen der Isoprenoidsynthese in den Plastiden. Isoprenoide sind in Pflanzen in einer großen Vielfalt vorhanden (Chappell, 1995; McGarvey und Croteau, 1995; Croteau et al., 2000) und erfüllen sehr unterschiedliche Funktionen im Pflanzenstoffwechsel. Sie können als Lock- und Abwehrstoffe wirken (Bartley und Scolnik, 1995; Hammerschmidt, 1999) oder essentielle Aufgaben in der Photosynthese, Respiration sowie in der Regulation von Wachstum und Entwicklung der Pflanze übernehmen (Sacchettini und Poulter, 1997; Penuelas und Munné-Bosch, 2005). Die Synthese von IPP und DMAPP erfolgt im Cytosol über den Mevalonat (MVA)-Stoffwechsel und in den Plastiden über den MEP-Stoffwechsel (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción und Boronat, 2002). Die plastidär synthetisierten Vorstufen DMAPP und IPP gehen z. B. in die Biosynthese von Carotenoiden und der Prenyl-Seitenketten von Chlorophyll, Plastochinon, Phyllochinon und Tocopherol sowie in die Synthese von Hormonen (Gibberelline, Abscisinsäure) ein. Über den cytosolischen MVA-Stoffwechselweg wird z. B. die isoprenoide Seitenkette der Cytokinine und Vorstufen für die Synthese von Brassinosteroiden, Sterolen und Dolicholen bereitgestellt. Trotz der Kompartimentierung kann es zwischen den cytosolischen und plastidären IPP-Pools einen Austausch geben, sowohl in Cytosol-Plastid Richtung (Kreuz und Kleinig, 1984; Soler et al., 1993; Milborrow und Lee, 1998) als auch aus dem Plastiden ins Cytosol (Blick und Lange, 2003). Dieser Austausch ist auch auf der Ebene anderer Prenyldiphosphate möglich (Adam et al., 1999; Steliopoulos et al., 2002; Blick und Lange, 2003; Hemmerlin et al., 2003).

1.5. Auswirkungen des Funktionsverlustes des PPT auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel in *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der postulierten Funktion des PPT, die Versorgung des Chloroplastenstromas mit PEP als Ausgangspunkt für plastidär lokalisierte Biosynthesen sicherzustellen, liegt die Vermutung nahe, dass der Funktionsverlust des PPT Störungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel in den *cue1*-Mutanten verursacht und für die Ausprägung des retikulierten Blattphänotyps verantwortlich ist. Dabei wurde gerade den Produkten des Shikimatweges eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps zugeschrieben. Dieser konnte durch die Supplementierung mit aromatischen Aminosäuren kuriert werden (Streatfield et al., 1999). Auch die Komplementation des *cue1*-Phänotyps durch Überexpression des (a) Blumenkohl-PPT und (b) der PPDK aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia* (Voll et al., 2003) unterstützt die These, dass der Mangel an PEP im Plastiden für die Störungen in der Entwicklung der *cue1*-Mutante verantwortlich ist.

Gegenüber den Kontrollen und den komplementierten Linien zeigen die *cue1*-Mutanten Limitationen in der Photosynthese, dem Calvin Zyklus und der Saccharose- und Stärkeakkumulation, die auf eine generelle Stoffwechselbeeinträchtigung zurückgeführt werden können (Voll et al., 2003). Die Beeinträchtigungen im Primärstoffwechsel der Mutanten korrelieren mit verringerten vegetativen und reproduktiven Wachstumsraten, die in den Allelen *cue1-1* und *cue1-6* nur noch ca. 75% der Kontrollen ausmachen (Voll, 2001). Ein zusätzliches Wachstumshemmnis kann durch Signale von den unterentwickelten *cue*-Plastiden (Li et al., 1995; Streatfield et al., 1999) hervorgerufen werden. Dieser Einfluss von „retrograden“ Signalen ist auch für die anderen *cue*-Mutanten (*cue3*, *cue4*, *cue6*, *cue8*, *cue9*) bereits beschrieben worden (López-Juez et al., 1998). Es wurde spekuliert, dass der PPT in die Signaltransduktion bei der Photomorphogenese eingebunden ist und möglicherweise eine Störung bei der Übermittlung des „retrograden“ plastidären Signals aufweist (Streatfield et al., 1999).

Interessanterweise ist nur der Gehalt der vom Shikimatweg abgeleiteten aromatischen Aminosäure Phenylalanin um 30-40% in den untersuchten *cue1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp verringert, während die Gehalte an Tryptophan und Tyrosin sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase gegenüber den Kontrollen leicht erhöht sind (Voll et al., 2003; Streatfield et al., 1999). In den Mutanten wurde ein Mangel an Plastochinon (Streatfield et al., 1999) und verringerte Polyamingehalte (Voll, 2001) festgestellt.

Die *cueI*-Mutanten zeigen ein vom Wildtyp abweichendes Spektrum an Phenylpropanen, für deren Synthese die Versorgung mit Phenylalanin als Vorstufe limitierend ist. Durch Fluoreszenzmikroskopie von Blattquerschnitten konnte gezeigt werden, dass die Gehalte an Zimtsäurederivaten mit UV-Schutzfunktion in der oberen Epidermis von *cueI-1* gegenüber den Kontrollen nicht vermindert sind und die dort lokalisierten Flavonoidkomponenten nur ein verändertes Spektrum zeigen (Voll, 2001). Die in *cueI*-Mutanten eingeschränkte Fähigkeit, Anthocyane bei anaerobem Stress zu akkumulieren (Streatfield et al., 1999), konnte in den komplementierten Linien *cueI-6/PPT* und *cueI-6/PPDK* wiederhergestellt werden (Voll et al., 2003).

Insgesamt wurden in den *cueI*-Mutanten keine generellen Beeinträchtigungen des Stoffwechsels beobachtet, die Effekte auf den Sekundärmetabolismus sind eher differentiell ausgeprägt. Dagegen wurden in *antisense*-TK-Tabakpflanzen, die eine verminderte Aktivität der Transketolase (TK), die für die Bereitstellung von Ery4P als Substrat für den Shikimatweg zuständig ist, aufweisen, generell drastisch reduzierte Gehalte aller aromatischen Aminosäuren und Phenylpropane, sowie Phenylpropanderivate wie Chlorogensäure, Kaffeesäure, Hydroxyzimtsäuren und Lignin festgestellt (Henkes et al., 2001). Allerdings wird durch die verringerte Transketolase-Aktivität auch der Calvin-Zyklus limitiert, so dass ein genereller Mangel an Kohlenstoffgerüsten für jegliche Art von Biosynthesen den Primär- und Sekundärstoffwechsel in den *antisense*-TK-Tabakpflanzen nachhaltig beeinflussen kann. Interessanterweise verhält sich der in den *antisense*-TK-Tabakpflanzen zu beobachtende Blattphänotyp genau umgekehrt zum retikulierten *cueI*-Phänotyp, denn die Tabaktransformanten zeigen chlorotische Leitbündelbereiche und ein intaktes Mesophyll (Henkes et al., 2001).

Der Phänotyp der *cueI*-Mutante kann nicht nur durch eine generelle Limitation im Shikimatweg erklärt werden (Voll et al., 2003). Die Verbindung zwischen den Limitationen im Shikimatweg in verschiedenen Geweben und Zelltypen der Pflanze und der Ausbildung des retikulierten Phänotyps der *cueI*-Mutante, muss vor dem Hintergrund der Existenz eines zweiten funktionalen PPT in *A. thaliana*, AtPPT2 (Knappe et al., 2003) untersucht werden. Obwohl ubiquitär im Blatt exprimiert, ist der endogene PPT2 nicht in der Lage, die durch den Funktionsverlust des PPT1 verursachten pleiotropen Defekte zu kompensieren. Durch konstitutive Überexpression des PPT2 im *cueI-6* Hintergrund konnte der Phänotyp jedoch teilweise kuriert werden (Knappe et al., 2003). Der PPT1-Promotor ist ausschließlich in leitbündelnahen Mesophyllzellen und im Leitgewebe selbst aktiv, also in genau den Zellen, deren Entwicklung in den *cueI*-Mutanten nicht beeinträchtigt ist

(Knappe et al., 2003). Deshalb wird für PPT1 eine Rolle in der Bereitstellung von Signalmetaboliten, die sich aus dem Phenylpropanmetabolismus ableiten und für eine korrekte Mesophyllentwicklung zuständig sind, vorgeschlagen (Knappe et al., 2003).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen sollen zur Klärung der Verbindung zwischen den durch den Funktionsverlust des PPT1 verursachten Limitationen im Phenylpropanstoffwechsel und der Ausbildung des retikulierten Phänotyps der *cue1*-Mutante beitragen. Dabei soll vor allem die Rolle des PPT1 in der Bereitstellung von Signalmetaboliten für die Mesophyllentwicklung untersucht werden. Über verschiedene Ansätze wie die Isolierung von Revertanten mittels „*Activation tagging*“ im *cue1*-Hintergrund und induzierbares RNAi für PPT1 im Wildtyp-Hintergrund, soll nach potentiellen Genen, die in diesen Signalweg eingebunden sind, gesucht werden.

Dazu dienen außerdem Fütterungen der *cue1*-Mutanten mit (a) Dehydrodiconiferylglucosid (DCG), ein Neolignan, als Phenylpropanoid-Derivat und möglicher Kandidat mit Signalfunktion sowie (b) Cytokinin und (c) Auxin, deren Signalwege von Phenylpropanen moduliert werden können.

Weitere Ansätze wie die Generierung von *ppdk*- und *p-enolase*-Mutanten sowie Doppelmutanten mit *cue1* sollten zeigen, welche Auswirkungen die Unterbrechung weiterer möglicher Wege, PEP im Plastidenstroma anzuliefern, auf die Entwicklung der Pflanze verursacht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK), BioRad (München), Biolabs (Schwalbach), Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Ferak (Berlin), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs, CH), GibcoBRL (Karlsruhe), Heraeus (Düsseldorf), Intas (Göttingen), Merck (Darmstadt), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher & Schuell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Stratagene (Amsterdam, NL).

2.1.2. Kommerzielle Kits

Folgende Kits wurden eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München)

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)

RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

2.1.3. Bakterien- und Hefestämme

2.1.3.1. *Escherichia coli*

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

DH5α zur Amplifikation von Plasmiden

supE44 ΔlacU169 (Φ80, lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Hanahan, 1983)

XL1-Blue zur Amplifikation von Plasmiden

supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac, F'[proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^r)]

Top10 zur Amplifikation von Plasmiden

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 (pMP90) zur Pflanzentransformation (Koncz und Schell, 1986)

GV3101 mit dem Hilfsvektor **pSoup** (Hellens et al., 2000) für den binären Vektor pGreenII

2.1.3.3. *Saccharomyces cerevisiae*

InvSc1 zur Proteinexpression

his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52

2.1.4. Vektoren

Folgende Vektoren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Klonierungen eingesetzt:

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Vektoren

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pGEM-T® Easy	Promega	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pCR®2.1.-TOPO®	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pGreenII	Hellens et al., 2000	Pflanzentransformation
pSKI015	Weigel et al., 2000	Pflanzentransformation Activation tagging
pKannibal	Wesley et al., 2001	Klonierung von RNAi Konstrukten
pUCΔ <i>alcAN</i>	Caddick et al., 1998	Klonierung von RNAi Konstrukten
pBinΔ <i>alcR</i>	Caddick et al., 1998	Klonierung von RNAi Konstrukten

2.1.5. Pflanzenmaterial

Es wurden die folgenden *Arabidopsis thaliana* Linien verwendet:

Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Linien

Linie	Ökotyp/Hintergrund
Col-0	Wildtyp
pOCA108	Bensheim
<i>cue1-1</i>	pOCA108
<i>cue1-6</i>	Col-0
T-DNA Insertionslinie (Salk Institut) N616157 (<i>ppdk</i>)	Col-0
T-DNA Insertionslinie (Salk Institut) N521328 (<i>p-enolase</i>)	Col-0
T-DNA Insertionslinie (Salk Institut) N584529 (<i>lcd1</i>)	Col-0

2.2 Methoden

2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis* auf Erde

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf einem Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgelegt. Vor der Aussaat wurde das Substrat mit Leitungswasser durchtränkt. Die Pflanzschalen wurden mit Pikierhauben abgedeckt, um Kontaminationen mit Fremdsamen zu vermeiden und um – sobald die Brechung der Samenruhe erfolgt war – für feucht-warme Bedingungen zu sorgen. Zur Stratifizierung kamen die Saattöpfe zunächst für zwei Tage in den Kühlraum (4°C). Später wurden die Pflanzschalen bzw. Töpfe in das Gewächshaus oder in die Phytokammer gestellt. Die Anzucht im Gewächshaus erfolgte bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h, also im extremen Langtag, bei einer täglichen Photonendosis von ca. $150\text{--}200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Quantameter LI-1000 der Fa. Li-Cor) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40%. In der Lichtperiode betrug die Temperatur ca. 21°C und während der Dunkelphase ca. 18°C. In der Phytokammer wurden die Pflanzen bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h und einer Photonendosis von $70\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogen. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug ebenfalls etwa 40%. Für die Beleuchtung in der Phytokammer wurde eine Mischung aus Tageslicht-Neonröhren der Firma Osram (Tageslicht L58W/11-860, Warmweiß L58W/30, Natura de Luxe L58W/76 und FluorA L58W/77) verwendet. Die Temperatur betrug ca. 22°C während der Lichtphase und ca. 18°C während der Dunkelperiode.

Nachdem die Keimblätter vollständig entfaltet waren, konnte die Pikierhaube abgenommen werden. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die Pflanzen mit Leitungswasser angestaut. Gedüngt wurde nach Bedarf mit Hoagland-Medium (1:1 mit Leitungswasser verdünnt) für *Arabidopsis*. 10-14 Tage nach der Aussaat konnten die Pflanzen entweder in runde Einzeltöpfe (\varnothing 6 cm oder \varnothing 9 cm) oder in eine Multitray-Schale à 77 Pflanzmulden pikiert werden.

Schädlingsbekämpfung erfolgte mit Gelbtafeln der Firma Neudorff (Emmerthal, FRG) und einmal wöchentlich durch Sprühen mit Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbruch) zur Bekämpfung eines eventuellen Befalls durch Trauermückenlarven. Bei Blattlausbefall wurden als Nützlinge Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbruch) ausgebracht oder Confidor als 25%ige Emulsionsspritzlösung eingesetzt.

2.2.2. Sterilisation des *Arabidopsis thaliana* Saatguts

2.2.2.1. Flüssige Oberflächensterilisation von Samen

Die Sterilisierung der Samen erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Zunächst wurden die Samen in 30%iger Na-Hypochlorit-Lösung mit 1 Tropfen Tween-20 für 10 min geschwenkt. Nachdem die Samen sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen und die Samen dreimal mit sterilem Leitungswasser gewaschen.

2.2.2.2. Oberflächensterilisation mit Chlorgas

Ein Becherglas mit 100 ml Na-Hypochlorid und die geöffneten Eppendorfgefäße mit den Samen wurden in den Exsikkator gestellt. Nach Zugabe von 3 ml konzentrierter Salzsäure zum Na-Hypochlorid wurde der Exsikkator schnell geschlossen. Die Sterilisierung der Samen erfolgte für 3-6 h durch das sich entwickelnde Chlorgas. Anschließend wurden die Gefäße mit den Samen für ca. 2 h zum Abdampfen unter die Sterilbank gestellt.

2.2.3. Anzucht von *Arabidopsis* auf Agar-Platten

Sterilisierte Samen wurden auf MS-Platten ausgelegt und für zwei bis drei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Klimaschrank (RUMED 1200; Fa. Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) bei 22°C unter einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 h und einer Photonenflussdichte von ca. $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

MS-Platten:

1% (w/v) Saccharose
0,44% (w/v) Murashige & Skoog (Duchefa, Haarlem, NL, Kat.-Nr. M0245)
0,8% (w/v) Agar (Difco)
pH 5,6/KOH

Das MS-Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Mediums konnten die fertigen Platten direkt verwendet oder einige Tage bei 4°C gelagert werden.

2.2.4. Pflanzen-Selektionen

2.2.4.1. Selektion auf Agarplatten

Für Selektionen auf Agarplatten wurden Antibiotikastammlösungen zum autoklavierten Medium hinzugefügt:

Kanamycin 50 µg/ml Endkonzentration

DL-Phosphinotricin 10 µg/ml Endkonzentration

2.2.4.2. Selektion auf Erde mit BASTA

Transgene Pflanzen, die das *bar*-Gen enthielten, welches die Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin (BASTA) vermittelt, wurden auf Erde angezogen und nach Entwicklung der ersten Primärblätter (Vierblatt-Stadium) selektiert. Die Pflanzen wurden mit der Herbizidlösung aus einem Abstand von ca. 30 cm besprüht. Wenn die Pflanzen sehr dicht standen, wurde dieser Vorgang nach ca. einer Woche wiederholt.

BASTA-Gebrauchslösung:

250 mg/l BASTA®

0,1% Tween-20

2.2.5 Transformation von *A. thaliana* durch Vakuuminfiltration

Agrobakterien wurden bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.0 angezogen, dann bei 4°C für 15 Minuten bei 2.500 xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden im Infiltrationsmedium aufgenommen (in ca. 1/3 des ursprünglichen Volumens).

Infiltrationsmedium:

½ MS-Medium mit Vitaminen

5% Saccharose

Tween-20

pH 5,8/KOH

Nach dem Entfernen der Schoten und offenen Blüten wurden die auf Erde gewachsenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen in einem Vakuumexsikkator kopfüber in die Agrobakterienlösung getaucht, so dass Blüten und Knospen gut bedeckt waren. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde für 3 x 5 Minuten ein Vakuum angelegt. Anschließend wurden die Blüten noch einmal mit der Agrobaktériensuspension benetzt und die Pflanzen für die nächsten zwei Tage mit einer Plastikhaube abgedeckt, die zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit von innen mit Leitungswasser gesprüht wurde.

2.2.6. Fütterung von *A. thaliana* mit Phytohormonen

A. thaliana Pflanzen wurden auf MS-Platten angezogen und nach ca. 3-4 Wochen auf frisches Medium umgesetzt, das mit verschiedenen Substanzen versetzt wurde. Dabei wurden die zusätzlichen Komponenten nach Abkühlen des autoklavierten MS-Mediums kurz vor dem Gießen der Platten hinzugefügt.

2.2.7. Mikrobiologische Methoden

2.2.7.1. Anzucht und Transformation von *Escherichia coli*

2.2.7.1.1. Anzucht von *E. coli*

Für die Anzucht der in 2.1.3.1 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurde eine Kolonie von einer Platte oder 10 µl einer Glyzerinstammkultur in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co Inc., Edison, New Jersey, USA; 250 rpm) bei 37°C inkubiert. Falls erforderlich, wurden Antibiotika zur Selektion hinzugesetzt. Stammkulturen wurden angelegt, indem 500 µl der

entsprechenden Bakterienkultur mit 500 µl 60%igem Glyzerin versetzt, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden.

LB-Medium

10 g	Trypton	
5 g	Hefeextrakt	
10 g	NaCl	ad 1 l H ₂ O _{dd}

LB-Platten

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco)

Indikatorplatten

2 g	Trypton	
1 g	Hefeextrakt	
0,2 g	NaCl	
0,5 g	MgCl ₂	
3 g	Agar	
400µl	Ampicillin (50 mg/ml in 1 M Tris-Cl pH 8.0)	
1 ml	2% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid	
40 mg	IPTG	ad 200 ml H ₂ O _{dd}

Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml

2.2.7.1.2. Herstellung von TSS-kompetenten Zellen

Zur Herstellung TSS-kompetenter Bakterien wurden nach der Methode von Chung & Miller (Chung und Miller, 1993) verfahren. Bakterien des DH5α-Stammes wurden in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison/USA) angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und 2 h bei 37°C unter

Schütteln bis zum Anfang der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert ($OD_{600} = 0.3-0.4$). Die Kultur wurde dann auf SS34-Becher verteilt und die Zellen im SS34-Rotor für 10 min bei 3.000 rpm sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10 ml eisgekühltem TSS-Medium aufgenommen und vereinigt, 15 min auf Eis gestellt, zu 50 μ l in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

LB-Medium:

2.2.7.1.1

TSS:

10% (w/v) Polyethylenglykol 8000 in LB-Medium

5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

20-50 mM MgCl_2

20-50 mM MgSO_4

pH 6,5/NaOH

autoklavieren

2.2.7.1.3. Transformation von TSS-kompetenten Bakterien

Zu 50 μ l auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz oder 50-200 ng Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Kultur wurde für 1 h bei 37°C leicht geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 200-1000 μ l auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.2.7.2. Anzucht und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.7.2.1. Anzucht von *A. tumefaciens*

Agrobakterien wurden in YEB-Medium mit selektiven Antibiotika bei 28°C unter Schütteln angezogen (250 rpm). Die Lagerung der Bakterien erfolgte auf Agarplatten für einige Wochen bei 4°C und längerfristig als Glycerin-Stammkulturen bei -80°C.

YEB-Medium:

5 g	Bacto-Pepton	
5 g	Fleischextrakt (Rind)	
1 g	Hefeextrakt	
5 g	Saccharose	
0,5 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	ad 1 l H ₂ O _{dd}

YEB-Platten:

YEB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

Antibiotikakonzentrationen:

Carbenicillin	100 µg/ml
Gentamycin	25 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Rifampicin	150 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml

2.2.7.2.2. Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5 ml MGL angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen Sättigung gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100 ml MGL verdünnt, so dass die OD₆₀₀ ca. 0.04-0.08 betrug. Die Agrobakterien wurden ca. 4 h bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0.5 angezogen. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 min, 4°C, 2.500 g) und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES (pH 7.0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Agrobakterien im gleichen Volumen eisgekühltem

1 mM HEPES (pH 7.0), 10% (v/v) Glyzerin aufgenommen, wiederum sedimentiert und dann in 2 ml eiskaltem 1mM HEPES (pH 7.0), 10% (v/v) Glyzerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, für 30 s sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/Glyzerin aufgenommen. 50 µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

MGL-Medium:

0,5% (w/v)	Bacto-Trypton	
0,25% (w/v)	Hefe-Extrakt	
0,5% (w/v)	NaCl ₂	
0,5% (w/v)	Mannit	
0,116% (w/v)	Na-Glutamat	
0,025% (w/v)	KH ₂ PO ₄	
0,01% (w/v)	MgSO ₄	
1 mg	Biotin	ad 1 l H ₂ O _{dd}

autoklavieren

2.2.7.2.3. Elektrotransformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zu 50 µl gefrorenen, kompetenten Agrobakterien wurden 2 µl DNA (0,5 µg) gegeben und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in eine eiskalte 0,2 cm Elektroporationsküvette (PEQlab, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV Puls. Der Transformationsansatz wurde sofort mit 1 ml YEB-Medium versetzt und 2 h bei 28°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zellen für 30 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert und in 200 µl YEB-Medium resuspendiert. 10-50 µl wurden auf eine YEB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, die Platte mit Parafilm abgedichtet, und nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 28°C konnten einzelne Kolonien transformierter Agrobakterien großflächig auf weitere selektierende YEB-Platten ausgestrichen werden.

2.2.7.3. Anzucht und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

YPD-Medium:

1% (w/v) Bacto-Pepton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Glukose

autoklavieren

YPD-Agarplatten:

YPD-Medium mit 2% (w/v) Bacto-Agar (Difco)

SC-Minimalmedium:

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base

5% (w/v) 40% (w/v) Glukoselösung, sterilfiltriert

1% (v/v) 10x Dropout (-Ura)

SC-Platten:

SC-Minimalmedium mit 2% (w/v) Bacto-Agar (Difco)

10 x Dropout (-Ura):

0,03% (w/v) Isoleucin

0,15% (w/v) Valin

0,02% (w/v) Adenin

0,02% (w/v) Arginin

0,02% (w/v) Histidin

0,1% (w/v) Leucin

0,03% (w/v) Lysin

0,02% (w/v) Methionin

0,05% (w/v) Phenylalanin

0,2% (w/v) Threonin

0,02% (w/v) Tryptophan

1 x TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
1 mM	EDTA

1 x LiAc/0,5 x TE

5 mM	Tris/HCl, pH 7.5
100 mM	Lithiumacetat
0,5 mM	EDTA

1 x LiAc/40% PEG-3350/1 x TE

10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
100 mM	Lithiumacetat
1 mM	EDTA
40% (w/v)	PEG-3350

10 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie InvSc1 angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Dann wurde die Kultur zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.4 in 50 ml YPD-Medium verdünnt und weitere 2-4 h herangezogen. Nach Zentrifugation der Zellen für 15 min bei 1.500 xg und Aufnahme des Pellets in 40 ml 1 x TE, wurden die Zellen wieder 15 min abzentrifugiert und in 2 ml 1 x LiAc/0,5 x TE aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 min. Für jede Transformation wurde nun 1 µg Plasmid-DNA mit 100 µg denaturierter Heringssperm-DNA und mit 100 µl der Hefezellen-Suspension gemischt. Nach Zugabe von 700 µl 1 x LiAc/40% PEG-3350/1 x TE wurde der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert, bevor 88 µl DMSO zugegeben und die Suspension sorgfältig durchmischt wurde. Anschließend wurden die Hefezellen für 7 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und 10 s anzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml TE aufgenommen, erneut zentrifugiert, das Pellet schließlich in 50-100 µl 1 x TE resuspendiert und auf SC/-Ura-Platten zur Selektion auf fehlende Uracil-Auxotrophie in den Transformanten ausgestrichen.

2.2.8. Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1. Extraktion und Präparation von DNA

2.2.8.1.1. Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Plasmidisolierung aus *E. coli* nach Birnboim & Doly (1979)

Am Vorabend wurden von einer Platte Klone gepickt oder 10 µl Bakterien aus Stammkulturen angeimpft. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht in 3 ml LB, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, bei 37°C im Schüttler (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co Inc., Edison, New Jersey, USA; 250 rpm).

Am nächsten Tag wurden 500 µl der Kultur abgenommen, mit 500 µl 60%igem Glycerin versetzt und als Stammkultur bei -80°C gelagert. Die restlichen Zellen wurden bei 14.000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Die Sedimente wurden dann in 100 µl Lösung I aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II zur alkalischen Lyse der Zellen wurde kräftig gemischt und die Suspension für weitere 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl eisgekühlter Lösung III wurde das Gemisch neutralisiert. Dabei fielen SDS, Proteine und die chromosomale DNA aus, die Plasmid-DNA blieb in Lösung. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt, gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA-Pellets wurden mit 200 µl RNase/H₂O_{dd}-Lösung (RNase-Konzentration: 10 µg/ml) versetzt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Um die RNase zu entfernen, wurden die Proben phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert, danach gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in einem adäquaten Volumen H₂O_{dd} aufgenommen.

Lösung I:

25 mM	Tris/HCl, pH 8.0
50 mM	Glukose
10 mM	EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

Lösung III:

3 M Kaliumacetat, pH 4,8

Plasmidisolierung aus *E. coli* mit Diatomerde

Größtenteils wurden Plasmide mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München) isoliert. Dabei wurden die pelletierten Bakterienzellen in 200 µl Lösung I resuspendiert und gevortext. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl Lösung II zugegeben und 10 x gemischt. Zur Neutralisierung wurden die Zellen mit 200 µl Lösung III versetzt und ebenfalls 10 x gemischt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand in Säulchen gefüllt, mit 200 µl DNA Bindungsmatrix gemischt und für 5 min zentrifugiert (14.000 rpm). Nach zwei Waschschritten erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer und Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm.

Lösung I:

50 mM Glucose

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA, pH 8.0

20 µg/ml RNase A

Lösung II:

0,2 N NaOH

1% SDS

Lösung III:

5,3 M Guanidin-HCl

0,7 M Kaliumacetat, pH 5.0

Bindungsmatrix:

5,3 M	Guanidin-HCl
20 mM	Tris pH 8.0
0,15 g/ml	Diatomerde

Waschpuffer:

20 mM	Tris-HCl, pH 8.0
2 mM	EDTA, pH 8.0
0,2 M	NaCl
50%	Ethanol

2.2.8.1.2. Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Die Präparation genomischer Pflanzen-DNA für PCR-Analysen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Edwards et al. (1991).

Ein bis drei Rosettenblätter von *A. thaliana* wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen geerntet und entweder sofort verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde dann mit einem Bohrer ca. 15 s bei RT zerrieben. Das homogenisierte Gewebe wurde mit 400 µl Extraktionspuffer in ein Eppendorfgefäß überführt und kurz gevortext. Gewebetrümmer wurden bei 13.000 rpm für 2 min sedimentiert und 300 µl des Überstandes mit dem gleichem Volumen Isopropanol in einem frischen Reaktionsgefäß vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die gefällte DNA bei 13.000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Sediment im Exsikkator oder unter dem Abzug getrocknet. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 30-50 µl 1 x TE oder H₂O_{dd}. Je PCR-Ansatz wurden 1-3 µl der Präparation eingesetzt.

Extraktionspuffer:

200 mM	Tris/HCl, pH 7.5
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5% (w/v)	SDS

2.2.8.1.3. Präparation genomischer DNA nach der CTAB-Methode

Eine schnelle Möglichkeit zur Präparation genomischer DNA in guter Qualität (z. B. für Southern Blot Analysen geeignet) stellt die Isolation von DNA aus *Arabidopsis thaliana* Blüten nach der Methode von Liu (Liu et al., 1995) dar. Dazu wurden zwei bis drei Blütenstände in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem Bohrer wurde das Pflanzenmaterial zerrieben und unter Zugabe von 2 x 250 µl Extraktionspuffer homogenisiert. Dann wurden 400 µl PCI hinzugefügt und vorsichtig und gründlich gemischt und 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit 0,8 Volumen Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation von 10 min bei 3.500 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und 15 min unter dem Abzug getrocknet. Das Pellet wurde danach in 50 µl TE/RNaseA (10 µg/ml) resuspendiert und konnte bei -20°C gelagert werden. Für einen anschließenden Verdau der DNA für genomische Southern Blots wurden 32 µl der DNA in einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt.

2 x Puffer:

0,6 M	NaCl
100 mM	Tris/HCl, pH 7.5
40 mM	EDTA
4% (w/v)	Sarkosyl
1% (w/v)	SDS

Extraktionspuffer:

25 ml	2 x Puffer
20 ml	12 M Harnstoff
2,5 ml	Phenol
2,5 ml	H ₂ O

PCI:

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1

TE:

10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
1 mM	EDTA

2.2.8.4. Identifizierung von T-DNA Insertionslinien in *A. thaliana*

SALK-Linien sind T-DNA Insertionslinien vom Salk Institute Genome Analysis Laboratory, SIGnAL. Die Datenbank enthält T-DNA Insertionslinien mit Angabe der Position der Insertion. Die Insertionslinien sind der Alonso/Crosby/Ecker-Kollektion mit dem Hintergrund *Arabidopsis thaliana* Col-0 entnommen. Der Vertrieb der Samen wurde über das Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC abgewickelt.

Die genomische DNA der aus den Samen gewonnenen Pflanzen wurde isoliert und mittels PCR (2.2.8.9.1) mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden auf die Gegenwart der T-DNA hin überprüft.

2.2.8.5. Elektrophorese von DNA

Nukleinsäuren wurden für analytische und präparative Zwecke durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Maniatis, 1982). In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Die eingewogene Agarose wurde in dem erforderlichen Volumen 1 x Tris-Acetat Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Dann wurde eine Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und kann diese unter UV-Licht sichtbar machen. Ein eingesteckter Gelkamm diente zur Bildung von Probenfächern. Nach Erstarren des Gels wurde es mit 1 x Tris-Acetat Puffer bedeckt. Als Standard zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein 1 kb Längenstandard (Invitrogen, Eggenstein) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Gelgefäße mit Stopp-Puffer versetzt. Es wurde eine Stromstärke von 1-1.5 mA pro cm² Gelfläche, bis zur ausreichenden Auftrennung der DNA, angelegt.

DNA-Fragmente konnten aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe von QIAquick Gel Extraction Kit oder MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert werden.

10 x Stopp-Puffer:

20% (w/v) Ficoll 400

100 mM EDTA

1% (w/v) SDS

0,05% (w/v) Bromphenolblau

0.05% (w/v) Xylenblau

Tris-Acetat-Puffer:

40 mM Tris-Acetat, pH 7.5

1 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung:

5% (w/v) Ethidiumbromid in Methanol

2.2.8.6. Quantifizierung von DNA

2.2.8.6.1. Photometrische Quantifizierung von DNA

Nukleinsäuren absorbieren maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Aus der Absorption der Lösungen bei $\lambda = 260$ nm kann unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten der Nukleinsäure bei dieser Wellenlänge die Konzentration berechnet werden. Verunreinigungen der DNA-Präparationen z. B. durch Phenole und Polysaccharide konnten über die Absorptionsverhältnisse A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} überprüft werden. Die Werte sollten dabei zwischen 1,7 und 2 liegen.

Für die Messung der Konzentration wurde die DNA mit TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei den entsprechenden Wellenlängen in einer Quarzküvette gegen TE-Puffer als Referenz im Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg) gemessen. Die Absorptionsdifferenz von 0,1 entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA/ml.

2.2.8.6.2. Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen

DNA-Mengen konnten durch den Vergleich der Quantifizierungsergebnisse der aufgetragenen Proben mit denen des Molekulargewichtsmarkers bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.2.8.7. Southern-Blot

2.2.8.7.1. Southern-Blot für genomische DNA

Für *Southern-Blot* Analysen (Southern, 1975) wurde die isolierte genomische DNA (2.2.8.1.3) mit Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA zunächst denaturiert, indem man das Gel für 30 min unter leichtem Schwenken in Denaturierungslösung inkubierte. Nach Neutralisierung für 30 min in Neutralisierungspuffer wurde mit einer hochkonzentrierten Salzlösung (20 x SSC) geblottet.

Dabei wird der 20 x SSC-Puffer unter Ausnutzung der Kapillarkräfte durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Die DNA wandert mit und wird an die Membran gebunden.

Beim Aufbau des Blots wurde zunächst 20 x SSC in eine Wanne gefüllt, mit einer Glasplatte abgedeckt und Whatman Papier über die Glasplatte gelegt, so dass es auf beiden Seiten in den Puffer eintauchte. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das mit 20 x SSC getränkte Whatman Papier gelegt, darauf wurde dann eine mit 1 x SSC getränkte Nylonmembran (HybondTM-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England) positioniert. Das Gel wurde abgedichtet, auf die Membran 4 Lagen mit SSC getränktem Whatman-Papier gelegt und darüber ein ca. 5 cm hoher Stapel Küchenpapier positioniert. Zur Beschwerung des Blots wurde eine Glasplatte und ein Gewicht von ca. 1 kg aufgelegt. Nach 12-16 h konnte der Blot abgebaut werden, die Membran wurde kurz in 2 x SSC geschwenkt, im „Stratalinker“ (Stratagene Europe, Amsterdam, NL) mit UV bestrahlt (kovalente Bindung der DNA) und getrocknet.

20 x SSC:

0,3 M	Na-Citrat
3 M	NaCl

Denaturierungslösung:

1,5 M	NaCl
0,5 M	NaOH
pH 12-13	

Neutralisierungslösung:

2 M	NaCl
1 M	Tris-HCl
pH 5,5	

2.2.8.7.2. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Bei der Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente (Labeling) nach Feinberg und Vogelstein (1983) wird ^{32}P über die α -Phosphatgruppe von α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP in das Zucker-Phosphat-Rückgrat enzymatisch synthetisierter Nukleinsäuren eingebaut.

Dafür wird die zu markierende DNA zunächst denaturiert (95%) und der komplementäre DNA-Strang anschließend durch eine DNA-Polymerase neu synthetisiert. Da der Reaktion ein radioaktives Desoxynukleotid zugesetzt wird, kann der neu synthetisierte Strang mit einer hohen spezifischen Aktivität markiert werden. Als Primer für die Neusynthese dienen Desoxyhexanukleotide mit zufälliger Sequenz, die an beliebige Stellen eines DNA-Einzelstranges binden können.

30 μl DNA-Lösung (200-500 ng) wurden mit 10 μl Oligomarkierungspuffer versetzt, für 10 min auf 95°C zur Denaturierung der DNA-Stränge erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen und Abzentrifugieren der Lösung wurden 2 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 3 U Klenow-Fragment (Boehringer, Mannheim), sowie ca. 30 μCi $[^{32}\text{P}]$ -dATP hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37°C oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch eine Fällung für 5 min auf Eis mit einem Ansatz aus Trichloressigsäure (TCA) und Heringssperm-DNA mit anschließender Zentrifugation

(7 min, 13.000 rpm) und Vergleich der Aktivitäten in Sediment und Überstand kontrolliert. Ab einer Markierungsrate von mindestens 70% wurden die Ansätze weiter aufgearbeitet. Die Trennung der Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden fand über eine Säule (MicroSpin S-200 HR Colum, Pharmacia, Freiburg) statt.

Oligomarkierungspuffer (5x):

Lösung A	:	Lösung B	:	Lösung C
100	:	250	:	100

Lösung A:

1,25 M	Tris/HCl, pH 8.2
125 mM	MgCl ₂
2% (v/v)	β-Mercaptoethanol
je 0,5 M	dCTP, dGTP, dTTP

Lösung B:

2 M	HEPES/NaOH, pH 6.6
-----	--------------------

Lösung C:

3,6 µg/µl	Desoxyhexanukleotide
-----------	----------------------

TCA-Ansatz (Fällung):

100 µl	H ₂ O
5 µl	Heringssperm-DNA (10mg/ml), denaturiert
1,5 µl	Labeling-Ansatz
135 µl	TCA (20%)

2.2.8.7.3. Hybridisierung von *Southern*-Blots

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wurde bei 65°C für 2 h in Hybridisierungslösung mit 1/100 Volumen 0,01% Heringssperm-DNA vorinkubiert. Dann wurde die markierte Sonde für 10 min bei 95°C denaturiert, zur Vorhybridisierung gegeben und über Nacht im Hybridisierungsofen (Fa. Hybaid, Heidelberg) inkubiert.

Danach wurde die Membran zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität mehrmals mit zunehmender Stringenz, also abnehmender Salzkonzentration, für jeweils 20 min bei 65°C gewaschen. Auf die getrocknete Membran wurde für mehrere Stunden bis zu einigen Tagen ein Phosphor Screen (Molecular Dynamics, Krefeld) gelegt. Die Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte nach Einscannen der auf dem Screen gespeicherten Informationen auf einem Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics, Krefeld) mit dem Computerprogramm Image Quant Mac (Version 1.2).

100 x Denhardt:

2% (w/v)	Ficoll 40
2% (w/v)	PVP 40
2% (w/v)	BSA

Hybridisierungslösung:

4-6 x	SSC
3-4 x	Denhardt
0,5% (w/v)	SDS

Waschlösung:

0,5-2 x	SSC
0,5% (w/v)	SDS

Heringssperm-DNA:

0,01% (w/v)	Heringssperm-DNA, sonifiziert
-------------	-------------------------------

2.2.8.8. Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.8.8.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den von den Herstellern mitgelieferten Puffern. Es wurden 0,5-3 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Enzymaktivität pro 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg der DNA in 60 min bei der korrekten Temperatur und im entsprechenden Puffer in einem

50 µl Ansatz vollständig zu verdauen. Der Restriktionsansatz wurde für 1-4 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert.

2.2.8.8.2. Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren

Zu dem linearisierten Vektor wurden 1 U SAP (alkalische Phosphatase aus Shrimps; „*shrimp alkaline phosphatase*“) und 1 x Dephosphorylierungspuffer in einem Volumen von 10 µl hinzugefügt. Der Ansatz mit glatt endenden („*blunt-end*“) DNA-Fragmenten wurde für 60 min bei 65°C, der mit überhängend endenden („*sticky end*“) DNA-Fragmenten für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP für 15 min bei 65°C inaktiviert.

2.2.8.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente, die endständige 3'-OH-Gruppen tragen, mit solchen, die 5'-Phosphatgruppen besitzen. Die Reaktion findet unter ATP-Hydrolyse statt. Dabei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. Für Ligationen in einem linearisierten Vektor wurden 100-200 ng Vektor-DNA eingesetzt. Das DNA-Fragment und der Vektor wurden im molaren Verhältnis 5:1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 x Ligase-Puffer (Promega) gemischt und mit 1-2 U T4-DNA-Ligase (Promega) versetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 13°C durchgeführt.

2.2.8.8.4. Klonierung in TOPO-TA® Vektoren

Die Klonierung von PCR-Produkten in den TOPO-TA® Vektor erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

2.2.8.9. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

2.2.8.9.1. PCR (Standardmethode)

Die PCR (*Polymerase chain reaction*) ist eine Primer-gesteuerte Methode der enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Das Prinzip der *in vitro* DNA-Vermehrung beruht auf einem sich 25-35fach wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung der reziproken Oligonukleotide und Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Die Verdopplung einer spezifischen DNA-Sequenz mit jedem Zyklus bedeutet einen exponentiellen Anstieg der Konzentration des von den Primern definierten DNA-Fragmentes.

Ein Standard-Ansatz für eine PCR enthält jeweils:

1/10 Vol	10 x PCR-Puffer (z. B. Qiagen)	
0,2 µl	dNTPs, je 10 mM	
0,5 µl	for-Primer (10 pmol/µl)	
0,5 µl	rev-Primer (10 pmol/µl)	
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase	
1-2 µl	DNA-Präparation	ad 25 µl mit H ₂ O _{dd}

Die PCRs wurden in verschiedenen Thermozykler-Geräten durchgeführt.

Ein Standard-Programm setzt sich wie folgt zusammen:

Denaturierung:	94°C, 3 min	
<hr/>		
Denaturierung:	94°C, 1 min	
<i>Annealing</i> :	<i>Tann.</i> , 30 s	ca. 34 Zyklen
Elongation:	72°C, x min	
<hr/>		
Elongation:	72°C, 3 min	
konstante Temperatur:	4°C, ∞	

Die *Annealing*-Temperatur (*Tann.*) wird aus dem GC-Gehalt der eingesetzten Primer berechnet: $Tann. = 2\text{ }^{\circ}\text{C} \times (A + T) + 4\text{ }^{\circ}\text{C} \times (G + C)$

A = Anzahl der dATP in der Primersequenz

T = Anzahl der dTTP in der Primersequenz

G = Anzahl der dGTP in der Primersequenz

C = Anzahl der dCTP in der Primersequenz

Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments, pro 1 kb wurde 1 min eingestellt.

2.2.8.9.2. PCR-Walking

Mit Hilfe des PCR-Walking können in T-DNA Insertionslinien die T-DNA flankierenden DNA-Sequenzen ermittelt werden. Die Methode, modifiziert nach Varotto et al. (2000) und Cottage et al. (2001), diente zur Identifizierung der T-DNA-Insertionsstellen in den in dieser Arbeit hergestellten „*Activation tagging*“ Mutante.

Hierzu wurde die isolierte genomische DNA (50-100 ng) einer T-DNA Insertionslinie mit zwei Restriktionsenzymen (*blunt-end*) bei 37°C für 2-3 h verdaut und mit asymmetrischen Adaptoren ligiert. Durch die Kombination von Adaptor spezifischen Primern mit T-DNA spezifischen Oligonukleotiden, ist es möglich, unbekannte genomische T-DNA flankierende Regionen zu amplifizieren.

Zur Generierung einer Bindestelle für den Adaptor Primer, wurde nach der Ligation eine enzymatische Primerverlängerung (*primer extension*) mit einem Walking Primer durchgeführt. Anschließend erfolgte eine PCR mit nach innen versetzten, den Walking und Adaptor Primer überlappenden Oligonukleotiden. Die PCR-Produkte konnten direkt oder nach Zwischenklonierung in einen Vektor sequenziert werden.

1. Ansätze für den DNA-Verdau:

50-100 ng	genomische DNA	
2 µl	10 x <i>Csp6I/Hin6I</i> Puffer	
2 U	<i>Csp6I/Hin6I</i>	ad 20 µl H ₂ O _{dd}

2. Vorbereitung der Adaptor-Ansätze APL1632 (*Csp6I*) und APL1732 (*Hin6I*)

Annealing Puffer:

10 mM Tris, pH 7.5

10 mM MgCl₂

Die Primer wurden in *Annealing* Puffer auf 25 pmol/μl verdünnt und zu gleichen Anteilen gemischt, um folgende Kombinationen zu erhalten:

LR32 + APL16 = APL1632

LR32 + APL17 = APL1732

Die Ansätze wurden für 5 min bei 80°C inkubiert, sehr langsam abgekühlt und bei -20°C gelagert.

3. Ligation:

2 μl 10 x Ligase-Puffer (Promega)

2 μl APL1632/APL1732

0,5 μl DNA-Verdau

5 μl Ligase (Promega) ad 20 μl H₂O_{dd}

Die Ligation wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt.

4. Primerverlängerung:

4 μl Ligationsansatz

10 μl 5 x Go *taq* Puffer (Promega)

1 μl dNTPs (10 mM)

1 μl Primer A

0,2 μl Go *taq* (Promega) ad 50 μl H₂O_{dd}

5. PCR:

1 µl	Ansatz Primerverlängerung	
10 µl	5 x Go <i>taq</i> Puffer (Promega)	
1 µl	dNTPs (10 mM)	
2 µl	Primer B	
2 µl	LR26	
0,2 µl	Go <i>taq</i> (Promega)	ad 50 µl H ₂ O _{dd}

Beide PCRs (4 u. 5) wurden nach einem Standard-Programm durchgeführt (2.2.8.9.1).

Bei den Primern A und B handelte es sich um T-DNA spezifische Primer.

Nach der PCR wurde das Produkt komplett elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden herausgeschnitten und die DNA eluiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in den pCR® 2.1-TOPO® Vektor zwischenkloniert und mit Vektor spezifischen Primern (TOPO®-TA, Invitrogen) sequenziert.

2.2.8.9.3. Colony-PCR

Kolonien von Agrobakterien wurden mit Hilfe einer PCR, für die ganze Bakterienzellen eingesetzt wurden, auf das transformierte Konstrukt überprüft.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde etwas Kolonie von der Agar-Platte entnommen und in ein PCR-Gefäß mit 20 µl H₂O_{dd} überführt. Es wurde 20 min bei 94°C in einem PCR-Cycler inkubiert, um die DNA freizusetzen. Die PCR (Standardmethode) wurde im Anschluss daran durchgeführt.

2.2.8.10. DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzanalyse basierte auf dem Big Dye® Terminator v. 3.1 System der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), das die benötigten Reagenzien umfasste.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Hierbei führen die für die Reaktion

eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Desoxynukleotide (Dye Terminatoren) zu einem statisch verteilten Kettenabbruch.

Standard-Ansatz:

2 µl	BigDye® Terminator	
1 µl	Primer (10 pmol/µl)	
0,5-1 µl	dsDNA	ad 10 µl mit HPLC-H ₂ O

PCR-Programm:

96°C 20 s

96°C 10 s

50°C 10 s 34 Zyklen

60°C 4 min

4°C ∞

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben mit 10 µl HPLC-H₂O aufgefüllt und zur weiteren Bearbeitung an das Institut für Genetik der Universität zu Köln abgegeben. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des ABI-PRISM™ 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems GmbH), einem Mikroprozessor gesteuerten Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-Systems.

2.2.8.11. Extraktion und Präparation von RNA

2.2.8.11.1. RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode

Für die RNA Extraktion mit Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 50-100 mg Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde mit einem Bohrer unter Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz homogenisiert. Nach Inkubation für 5 min bei RT, wurden die Proben mit 200 µl

Chloroform versetzt und 15 s geschüttelt. Daran folgte eine Inkubation von 2 min bei RT, bevor die Proben bei 12.000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nach Inkubation für 10 min bei RT, wurden die Proben bei 7500 xg, 4°C, für 5 min zentrifugiert, das Pellet mit Ethanol gewaschen und an der Luft ca. 20 min getrocknet. Das Pellet wurde dann in 30-50 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

DEPC-H₂O:

0,2% DEPC (200 µl in 100 ml H₂O) für mindestens 1 h rühren und autoklavieren

2.2.8.11.2. Isolierung von RNA mit RNase-ALL

Das gefrorene Blattmaterial wurde im Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert, zu dem Pulver wurde 2 ml RNase-ALL gegeben und für weitere 2 min homogenisiert. Das Homogenat wurde auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei RT stengelassen. Zu diesen Homogenaten wurde jeweils 0,5 ml CI hinzugefügt, 10 s kräftig geschüttelt, 30 min auf Eis gelagert und anschließend für 10 min bei 12.000 xg zentrifugiert. Der wässrige Überstand (ca. 500 µl) wurde abgenommen, mit 0,7 Volumen 100% Ethanol und 1/20 Volumen 1 N Essigsäure vermischt und für 30-60 min bei 4°C gelagert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 14.000 xg, 4°C, für 10 min sedimentiert und das Pellet in 0,8 ml 3 M Na-Acetat resuspendiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 14.000 xg zentrifugiert, das Sediment zweimal vorsichtig mit 80% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit ca. 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

RNase-ALL:

50 g	Guanidinthiocyanat (Fluka)	
0,5 g	Na-N-Laurylsarcosin	ad 95 ml H ₂ O _{dd}

danach Zugabe von:

0,83 ml	3 M Na-Acetat, pH 5.2
---------	-----------------------

auf einer Heizplatte rühren und mit einigen Tropfen 10 N NaOH auf pH 7.0 einstellen

danach Zugabe von:

0,7 ml β -Mercaptoethanol ad 100 ml H_2O_{dd}

Die RNase-ALL-Lösung wurde in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit wassergesättigtem Phenol gemischt.

CI:

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

2.2.8.11.3. Isolierung von RNA mit RNeasy® Plant Mini Kit

Die Isolierung der RNA kann auch mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen) erfolgen. Dabei wird die Extraktion der RNA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.8.12. Quantifizierung von RNA

Wie die DNA (2.2.8.6.1) kann auch die RNA über die Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte hierbei zwischen 1,6 und 1,7 liegen. Eine Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 0,025$ entspricht einer RNA-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$.

Die Proben wurden 1:100 mit DEPC- H_2O verdünnt und die Extinktion bei den Wellenlängen $\lambda = 230$, $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ am Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg) gemessen.

2.2.8.13. RT-PCR

Für den DNase Verdau wurden 1-2 μg RNA eingesetzt, die mit 10 U RNase freier DNase I (Roche, Mannheim) in 1 x *First Strand Buffer* für 20 min bei 37°C inkubiert wurden. Dann wurde das Enzym nach Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 2,5 mM) für 10-15 min bei 65°C inaktiviert.

$\frac{1}{2}$ Volumen des DNase Verdaus (12,5 μl) wurde für die Reverse Transkription eingesetzt. Diese erfolgte mit Hilfe des SuperscriptTM II RNase H Reverse Transcriptase Kits von

Invitrogen. Der Reaktionsansatz enthielt 2 µl Oligo dT (500 ng/µl), 7,5 µl 5 x *First Strand Buffer*, 2,5 µl dNTPs (je 10 mM), 5 µl 0,1 M DTT und 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase. Der Ansatz wurde mit RNase freiem H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert. Als DNA-Vorlage in der nachfolgenden PCR konnten 1-5 µl des Ansatzes eingesetzt werden.

2.2.8.14. Microarray

Unter Verwendung des Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, USA) wurde ein Expressionsprofil bestimmter *A. thaliana* Pflanzenlinien erstellt. Gene, deren Expression sich in den zu vergleichenden Proben unterscheidet, konnten durch Scannen des Microarrays mit einem Laser-Detektions-System identifiziert werden.

Dafür wurde aus den entsprechenden Pflanzengeweben (Blatt und Wurzel) isolierte, sehr reine, RNA verwendet. Die Synthese der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten cRNA und die Hybridisierung der cRNA mit Agilent 60-mer Oligo arrays wurden nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, USA) durchgeführt. Mit Hilfe eines Microarray Scanners (Dual-Laser) konnten die Fluoreszenz-Intensitäten gemessen werden.

2.2.9. Biochemische Methoden

2.2.9.1. Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde in Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Das Trenngel wurde mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, das nach erfolgter Polymerisierung wieder entfernt wurde. Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von TEMED gestartet.

Die in Probenpuffer aufgenommenen Proteingemische und Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L (Sigma) wurden aufgetragen, liefen bei 10 mA in das Gel ein und wurden bei 40 mA für 5 min im Sammelgel fokussiert. Die Auftrennung erfolgte dann bei 25 mA im Trenngel.

4 x Sammelgelpuffer:

500 mM	Tris/HCl, pH 6.8
0,4%	SDS

4 x Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris/HCl, pH 8.8
0,4%	SDS

Sammelgelzusammensetzung:

25% (v/v)	4 x Sammelgelpuffer
15% (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,06% (w/v)	APS
0,3% (v/v)	TEMED

Trenngelzusammensetzung (12,5% Acrylamid):

25% (v/v)	4 x Trenngelpuffer
42% (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,05% (w/v)	APS
0,05% (v/v)	TEMED

Probenpuffer (2 x):

125 mM	Tris/HCl, pH 6.8
20% (w/v)	Glyzerin
5% (w/v)	SDS
5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,0025% (w/v)	Bromphenolblau

2.2.9.2. Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Die Proteinfärbung erfolgte nach Weber und Osborn (1969). Dazu wurden die Färbelösung I und II zu gleichen Teilen vermischt. Das SDS-PAGE-Gel wurde für ca. 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in Entfärbelösung geschüttelt, bei Bedarf fotografisch dokumentiert und in gespannter Zellophanfolie mehrere Tage lang luftblasenfrei getrocknet.

Coomassie Färbelösung I:

0,5% (w/v) Coomassie Brilliantblau (Serva-Blue G250, Serva)

80% (w/v) MeOH

Coomassie Färbelösung II:

20% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

10% (v/v) Essigsäure

40% (v/v) MeOH

2.2.9.3. Proteinfärbung mit Silbernitrat

Die Färbung wurde nach der Vorschrift von Blum et al., 1987 durchgeführt; sie ist ca. 5-10-fach empfindlicher als die Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (2.2.9.2).

Die Gele wurden zunächst 2 h in der Fixierlösung geschüttelt, dann 3 x 20 min mit Waschlösung I und 1 min mit Waschlösung II gewaschen. Nach drei Waschschritten mit H₂O für 20 s wurden die Gele für mindestens 20 min in Imprägnierlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O für jeweils 20 s wurden die Gele bis zum deutlichen Hervortreten der Banden in Entwicklerlösung inkubiert. Danach wurde erneut zweimal kurz mit H₂O gewaschen und für 30 min in Stopp-Lösung inkubiert. Anschließend konnten die Gele getrocknet werden.

Fixierlösung:

50% (v/v) Methanol
12% (v/v) Essigsäure
0,019% (v/v) Formaldehyd

Waschlösung I:

50% (v/v) Ethanol

Waschlösung II:

800 μ M Natriumthiosulfat

Imprägnierlösung:

0,2% (w/v) Silbernitrat
0,028% (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung:

6% (w/v) Dinatriumkarbonat
0,019% (v/v) Formaldehyd
18 μ M Natriumthiosulfat

Stopp-Lösung:

50% (v/v) Methanol
12% (v/v) Essigsäure

2.2.9.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen wurde mit einer Transfer-Kammer (Carboglass, Schleicher & Schuell) im *semi-dry-blot* Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) durchgeführt. Der Aufbau der Apparatur und die Vorbereitung der Lösungen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot®-System, Roth, Karlsruhe). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 60-90 min.

2.2.9.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran wurde der Bereich der Membran mit dem Molekulargewichtsmarker abgetrennt und in Coomassie-Brilliantblau angefärbt. Der Rest der Membran wurde in Blockierlösung überführt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde zweimal 10 min in TBST-T und einmal für 10 min in TBS gewaschen, bevor die Membran mit dem primären Antikörper (Mouse-Anti-Penta-His-IgG, Qiagen, Hilden), der sich gegen den Histidin-Tag des Proteins richtete, in einer 1:2000 Verdünnung in Blockierpuffer, für 2 h inkubiert wurde. Es folgten wieder drei Waschschriffe mit TBST-T und TBS, dann wurde der sekundäre Antikörper (Goat-Anti-Mouse-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) in einer 1:2500 Verdünnung in Blockierpuffer für 1-2 h eingesetzt. Danach wurde die Membran viermal für 10 min in TBST-T gewaschen. Für die Farbreaktion wurde die Membran in 10 ml Puffer mit 33 µl BCIP und 66 µl NBT geschwenkt, bis Signale sichtbar wurden. Die Färbelösung wurde dann kurz mit H₂O_{dd} abgespült und die Reaktion durch Inkubation für 5 min in 3% (w/v) TCA abgestoppt. Die Membran wurde nochmals mit H₂O_{dd} abgespült, getrocknet und zur besseren Konservierung in Folie eingeschweißt.

TBST-T:

10% (v/v)	10 x TBS
0,2% (v/v)	Triton X-100
0,05% (v/v)	Tween 20

TBS (10 x):

0,1 M	Tris/HCl, pH 7.4
1,5 M	NaCl

Puffer A:

100 mM	Tris/HCl, pH 9.5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

Blockierlösung:

3% (w/v) BSA in 1 x TBS

BCIP-Stammlösung:

5% (w/v) BCIP in DMF

NBT-Stammlösung:

5% (w/v) NBT in 70% (v/v) DMF

2.2.9.6. Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach Bradford (1976). Als Färbereagenz wurde Rotiquant (Roth) in einer 1:5-Verdünnung mit der Probe gemischt und die Extinktion photometrisch bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Als Eichreihe wurde eine Verdünnungsreihe von 0,5-20 μg BSA eingesetzt.

2.2.10. Physiologische Methoden**2.2.10.1. Transportexperimente mit Proteoliposomen****2.2.10.1.1. Expression des rekombinanten Proteins**

Kolonien, die auf SC-Platten (-Ura) gewachsen waren, wurden in 15 ml SC-Medium (-Ura) mit 2% Glukose überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde dann in 50 ml Induktionsmedium bis zu einer OD_{600} von 0.4 verdünnt. Dafür wurde das ermittelte Volumen an benötigter ü.N.-Kultur bei 1.500 xg (4°C) für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Hefezellen in 50 ml Induktionsmedium, SC (-Ura) mit 2% (w/v) Galaktose anstelle von Glukose aufgenommen. Nach weiteren 6-8 h im Schüttler (30%) wurden die Zellen bei 1.500 xg (4°C) für 5 min pelletiert und in 500 μl sterilem Wasser aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20% gelagert.

2.2.10.1.2. Mechanischer Aufschluss der Hefezellen

Die Zellen wurden nach Zusatz von PMSF mit Hilfe von Glasperlen unter starkem Schütteln aufgeschlossen. Die hierbei auftretenden Scherkräfte beschädigen die Zellwände und setzen so die Zellorganellen und die Proteine frei. Zellen einer 50 ml Kultur wurden in 250 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein mit 400 mg Glasperlen gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem TE-Puffer wurde 1/100 Volumen 100 mM PMSF zugefügt, um die während eines Zellaufschlusses aus der Vakuole freigesetzten Endo- und Exoproteasen am Proteinabbau zu hindern. Anschließend wurde für 6 min in einem Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) im Kühlraum (4°C) kräftig geschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Kühlraum. Zu dem Gemisch aus Glasperlen und Zellsuspension wurden nach 10 s Zentrifugation (2.250 xg) 750 µl TE/PMSF gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde erneut zentrifugiert (2.250 xg, 45 s) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch kurze Zentrifugation (1 min, 2450 xg) wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert. Der leicht trübe Überstand wurde abgenommen. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 42.000 rpm für 15 min (Kontron-Ultrazentrifuge, Centrikon T-1065, Rotor 65-13, 4°C) wurden lösliche und membrangebundene Fraktionen getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte Membranfraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
1 mM	EDTA

PMSF-Stammlösung:

100 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (in Ethanol)
--------	--

Glasperlen:

Ø ca. 0,5 mm

2.2.10.1.3. Reinigung von His-gekoppelten Proteinen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Mit einem Histidin-Tag versehene, heterolog exprimierte Proteine können durch Affinitätschromatographie über eine Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigt werden. Die Reinigung der rekombinanten Transportproteine erfolgte bei 4°C im Kühlraum. Ein Membranpellet entsprechend einer 100 ml Flüssigkultur wurde in 280 µl Puffer I aufgenommen. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 55 µl 20% (w/v) n-Dodecyl-β-maltopyranosid. Nach 5 min wurden 370 µl Puffer I zugegeben und der verdünnte Solubilisierungsansatz für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Stratagene, Pro Fuge, 5.600 xg). Der Überstand wurde abgenommen und mit zuvor äquilibriertem Ni^{2+} -NTA-Agarosematerial versetzt (Säulenmaterial ca. 80 µl). Der Ansatz wurde 1 h unter gleichmäßigem, langsamen Schütteln über Kopf inkubiert (Bindung des Proteins an die Ni^{2+} -NTA-Agarose). Nach Überführung des Ni^{2+} -NTA-Agarose/Proteingemisches in eine mit etwas Watte gefüllte Pasteurpipette, wurde die Säule dreimal mit 500 µl Puffer II gewaschen und das Protein mit 180 µl Puffer III eluiert.

Puffer I (Solubilisierungspuffer):

100 mM	NaH_2PO_4 , pH 8.0
50 mM	NaCl
8 mM	Imidazol

Puffer II (Waschpuffer):

10 mM	Tricin/KOH pH 7.6
8 mM	Imidazol
0,08% (w/v)	n-Dodecyl-β-maltopyranosid

Puffer III (Elutionspuffer):

150 mM	Imidazol
0,08% (w/v)	n-Dodecyl-β-maltopyranosid

2.2.10.1.4. Reinigung des Phospholipids

L- α -Phosphatidylcholin wurde zur Entfernung freier Fettsäuren nach der Methode von Krämer et al. (1977) gereinigt. Dazu wurden 30 g L- α -Phosphatidylcholin (Sigma) in 90 ml Chloroform gelöst, mit 540 ml entwässertem Aceton versetzt und für mindestens 2 h bei RT gerührt. Anschließend erfolgte die Fällung des Phosphatidylcholins bei 4°C über Nacht. Der Überstand mit den freien Fettsäuren wurde dekantiert und das Phospholipid in 100 ml Diethylether aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde in einem 500 ml Rundkolben im Rotationsverdampfer abgezogen. Letzte Reste an Ether wurden unter dem Abzug über Nacht abgedampft, das gereinigte Phospholipid mit einem Metallspatel aus dem Rundkolben geschabt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.10.1.5. Rekonstitution der Membranproteine

Der Einbau der Membranproteine in künstliche Membranvesikel erfolgte nach der Frier-Tau Methode von Kasahara und Hinkle (1977).

Für die Präparation der künstlichen Membranvesikel wurden Liposomenpuffer I (mit unterschiedlichen Substraten) und Liposomenpuffer II (für den Kontrollwert) mit 13% (w/v) gereinigtem Phospholipid versetzt und zur Vesikelbildung für 3 min auf Eis bei 30% Auslastung auf Stufe 5 beschallt (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury/USA). Im Anschluss wurden 600 μ l der Liposomensuspension mit ca. 150 μ l eines Protein/Detergenz Gemisches versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die schockgefrorenen Proteoliposomen wurden für einige Tage bei -80°C gelagert oder sofort auf Eis aufgetaut und für 30 Pulse bei einer Auslastung von 20% auf Stufe 5 beschallt. Danach wurde das Liposomengemisch auf eine dreimal mit PD10-Puffer voräquilibrierte Sephadex G-25-M Säule gegeben, um das nicht in die Proteoliposomen eingebaute externe Substrat durch Größenausschluss-Chromatographie abzutrennen. Nach Spülen der Säule von einmal 450 μ l, einmal 1000 μ l und einmal 500 μ l PD10-Puffer wurden die Liposomen mit 950 μ l PD10-Säulenpuffer eluiert und direkt für die Transportversuche eingesetzt.

Liposomenpuffer I:

100 mM	Tricin/KOH, pH 7.8
30 mM	Kaliumglukonat
30 mM	Substrat

Liposomenpuffer II:

100 mM	Tricin/KOH, pH 7.8
80 mM	Kaliumgluconat

PD10-Säulenpuffer:

150 mM	Natriumglukonat
50 mM	Kaliumglukonat
10 mM	Tricin/KOH, pH 7.8

2.2.10.1.6. Messung der TransportaktivitätVorbereitung der Anionenaustauschersäulen:

Pasteurpipetten wurden mit wenig Watte verstopft, mit 1.5 ml einer dichten Suspension von Anionenaustauscherharz (Dowex AG 1x8, Acetatform, 200-400 mesh, BioRad, München) in H₂O_{dd} gefüllt, mit 1 ml H₂O_{dd} gespült und mit zweimal 1 ml 200 mM Natriumacetat äquilibriert.

Dowex-Puffer:

0,2 M Natriumacetat

Abhängigkeit der Substrataufnahme in die Proteoliposomen von der Reaktionszeit (Kinetik):

Hierzu wurden 850 µl einer Proteoliposomen-Suspension mit 45 µl Substratlösung versetzt. Nach definierten Zeiten (15, 35, 55, 75 s) wurden je 200 µl der Liposomen aus dem Reaktionsansatz entnommen und zum Abstoppen des Transportes auf die mit Dowex-

Puffer äquilibrierten Anionenaustauschersäulen gegeben. Anschließend wurden die radioaktiv beladenen Liposomen mit einmal 0,5 ml und einmal 1 ml Dowex-Puffer in ein Szintillationsgefäß eluiert, wobei das nicht eintransportierte Substrat auf der Säule abgetrennt wurde. Die in den Liposomen transportierte Aktivität wurde im Szintillationszähler (Beckman LS6000TA, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA) bestimmt. Das an das Austauscherharz gebundene [^{32}P]-Phosphat wurde mit 3 x 1 ml 1 M HCl eluiert und entsorgt.

Substratlösung:

Pro Ansatz wurden 2-3 μCi [^{32}P]- NaH_2PO_4 mit 0,2 M KH_2PO_4 (pH 7.0) auf eine Phosphatkonzentration von 5 mM gebracht.

Abstoppen des Transportes durch ein Inhibitorengemisch:

Solange für die Versuchsauswertung der zeitliche Verlauf der Substrataufnahme nicht entscheidend war und z. B. nur die Substratspezifität bestimmt werden sollte, konnte der Transport auch zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Zugabe eines Inhibitorengemisches abgestoppt werden.

Dazu wurden 200 μl einer Proteoliposomen-Suspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl der radioaktiven Substratlösung gestartet und nach einer definierten Zeit (60-90 s) durch 25 μl Inhibitorlösung gestoppt. Durch Verwendung einer speziellen Apparatur („Plimper“), die aus einer mit Handgriff ausgestatteten Verbindung von 2x12 „Löffeln“ besteht und auf die die Inhibitorlösung vorgelegt wurde, konnten mehrere Ansätze gleichzeitig abgestoppt werden. In Kontrollansätzen, die der Bestimmung von unspezifisch in die Proteoliposomen aufgenommener Radioaktivität dienen, wurde den Liposomen vor dem Starten der Reaktion (vor Zugabe der Substratlösung) das Inhibitorgemisch zugegeben. Nach dem Reaktionsstopp wurden auch hier 200 μl der Liposomenlösung auf eine Dowexsäule gegeben, das weitere Vorgehen entspricht dem Versuchsablauf bei Messung einer Kinetik.

Inhibitormix:

100 mg/ml	Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)
10 mg/ml	4,4'-Diiodothiocyano-stilben-2,2'-disulfonat (DIDS) in 1.5 M Imidazol
35,4 mg/ml	Mersalyl

2.2.10.2. Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blatt- und Wurzelextrakten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die maximal extrahierbare Enzymaktivität aus Gewebeextrakten gemessen. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte über gekoppelte optische Tests, in denen die Kopplungsenzyme und Substrate im Überschuss zugegeben wurden, damit allein die Aktivität des untersuchten Enzyms geschwindigkeitsbestimmend war. Durch Substratmangelansätze konnten die gemessenen Aktivitäten gegen einen unspezifischen Hintergrund korrigiert werden.

2.2.10.2.1. Aufschluss des Blatt- und Wurzelmaterials

Arabidopsis thaliana Blatt- und Wurzelmaterial wurde abgewogen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

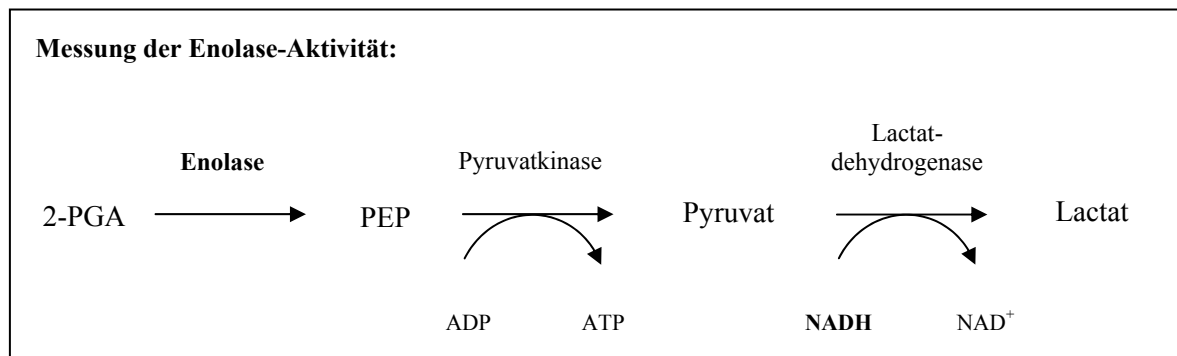
Die Proben wurden dann mit dem Bohrer unter Zugabe von einem 10fachen Volumen Extraktionspuffer homogenisiert. Die Extrakte wurden für 2 min bei 12.000 rpm (4°C) abzentrifugiert und Aliquots der Überstände für die Enzymtests eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei 30°C im Absorptionsmodus des *SpectraFluor plus* (SIL-Tecan, Crailsheim) und wurden mit den mitgelieferten Programmen (*EasyWIN kinetics*, SIL-Tecan, Crailsheim) ausgewertet.

Vor der Zugabe in die Reaktionsgemische wurden in NH_4SO_4 suspendierte Kopplungsenzyme 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, der ammoniumsulfathaltige Überstand abgenommen und das Sediment im gleichen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ wieder aufgenommen.

Von den Pflanzenextrakten wurden 10 µl für eine Proteinbestimmung abgezweigt, die bis zur Verwendung am gleichen Tag bei 4°C oder für eine spätere Messung in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.2.10.2.2. Enolase

Die Messung der Enolase-Aktivität wurde modifiziert nach Miernyk und Dennis (1982) durchgeführt.



Extraktionsmedium:

100 mM	HEPES/NaOH, pH 6.9
5 mM	MgCl ₂
0,05% (v/v)	Triton X-100
10% (v/v)	Glyzerin

Triton X-100 und Glyzerin wurden erst nach Einstellung des pH-Werts in den Puffer gegeben.

In den Reaktionsansätzen befanden sich je 200 µl Volumen:

100 mM	HEPES, pH 7.5
10 mM	MgCl ₂
2,7 mM	ADP
0,5 mM	2-Phosphoglycerat*
0,2 mM	NADH
5 U	Pyruvatkinase
6 U	Lactatdehydrogenase
5% (v/v)	Extrakt

*2-Phosphoglycerat wurde in den Ansätzen zur Hintergrundkorrektur weggelassen.

2.2.10.3. Histologische Lokalisierung von Sekundärmetaboliten

Arabidopsis thaliana Wurzelmaterial wurde ohne Zusätze oder nach Inkubation für 15-30 min in 0,25% Diphenylborat-2-aminoethylester (DPBA) + 0,005% Triton X-100 mit einem Anregungslicht von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einem Emissionsfilter von $\lambda > 420 \text{ nm}$ im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E800, Nikon, Düsseldorf) betrachtet und mit einem Kameraaufsatz (Nikon FDX-35, Nikon, Düsseldorf) fotografisch dokumentiert. Mit Hilfe von DPBA kann eine spezifische, gelb bis grünliche Sekundärfluoreszenz von Flavonoiden induziert werden.

2.2.10.4. Analyse der Gehalte an Flavonoiden über HPTLC

2.2.10.4.1. Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe

A. thaliana Blattmaterial wurde abgewogen, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -80°C. Die Proben wurden unter Zugabe von 2-3 Volumen 80% Methanol mit dem Bohrer homogenisiert und 15 min bei 70°C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C, für 10 min, wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und in

einem Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) bei 60°C ca. 1 h eingengt. Das Pellet wurde in 80% Methanol resuspendiert (1 µl/mg Pflanzenmaterial) und bei -80°C gelagert.

2.2.10.4.2. Auftrennung von Flavonoiden über HPTLC

Die Auftrennung der phenolischen Substanzen erfolgte über eine hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC), modifiziert nach Veit und Pauli (1999).

Die methanolischen Extrakte (2.2.10.4.1.) wurden kurz anzentrifugiert und 1-2 µl des Überstandes in 0,5 µl-Aliquots punktförmig auf den unteren Rand von Kieselgel-Platten (Kieselgel 60, Merck) aufgetragen. Die Platten wurden dann in eine Glaskammer gestellt (höchstens 2 Platten pro Kammer), die bis zu einer Höhe von ca. 1 cm, also bis kurz unterhalb der aufgetragenen Proben, mit einem Ethylacetat/Wasser/Essigsäure/Ameisensäure-Gemisch (100:26:12:12) gefüllt war. Nach der Entwicklung (ca. 20 min) wurden die Platten herausgenommen und kurz an der Luft getrocknet. Danach wurden die Platten mit 1%iger DPBA (Diphenylborsäure-2-Aminoethylester)-Lösung in MeOH ca. 3-4 x und anschließend 2 x mit 5% PEG4000 in MeOH besprüht. Die Behandlung mit PEG4000 diente zur Verstärkung der Farbreaktion. Unter UV-Anregung konnten die Platten fotografiert werden. Die Identifizierung der Inhaltstoffe erfolgte über die unterschiedlichen Fluoreszenzfarben.

2.2.11. Mikroskopie und Dokumentation

Folgende Geräte wurden verwendet:

Binokulare: Nikon SMZ-U

Mikroskope: Nikon Eclipse E800

Filter: **GFP**® – **BP** EX 460-500
DM 505
BA 510-560

UV – 2A EX 330-300
 DM 400
 BA 420

Dokumentation der mikroskopischen Aufnahmen:

1-CCD Farbvideokamera (KY-F1030; JVC, Singapore) bedient durch das Software Paket DISKUS (Technisches Büro Hilgers, Königswinter)

Kamera für normale Aufnahmen:

Digitale Kamera: Nikon Coolpix 995

2.2.12. Internetadressen

Aramemnon

<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>

Araxabia

<http://134.95.228.154:47111/>

NCBI Homepage

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

TAIR

<http://www.arabidopsis.org>

Genevestigator

<http://www.genevestigator.ethz.ch/>

SIGnAL

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Expression Angler

<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efp.Web.cgi>

3. Ergebnisse

Die *cue1*-Mutante (*ppt1*-Mutante) wurde ausführlich auf physiologischer und biochemischer Ebene untersucht (Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003). Um Anhaltspunkte für die Ursachen der verschiedenen Teilaspekte des pleiotropen *cue1*-Phänotyps zu erhalten, wurden Störungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel in der *cue1*-Mutante analysiert und mit den Kontrolllinien und den durch Überexpression von BoPPT und FtPPDK komplementierten *cue1*-Mutanten verglichen (Voll et al., 2003). Die Identifizierung eines zweiten PPT im Genom von *A. thaliana* (AtPPT2) und die gewebe- und zellspezifischen Expressionsanalysen beider *PPT*-Gene (Knappe et al., 2003) haben neue Fragen hinsichtlich des kausalen Zusammenhangs zwischen dem Funktionsverlust von AtPPT1 und der Störung in der Entwicklung der *cue1*-Mutante, die sich in dem charakteristischen retikulierten Blattphänotyp manifestiert, aufgeworfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde über verschiedene Ansätze versucht, diesen Zusammenhang zu erhellen. Hierbei wurde insbesondere die Einbindung von AtPPT1 und nachgeschaltete Reaktionen in eine bislang noch nicht näher charakterisierte Signaltransduktionskette hervorgehoben, die eine mögliche Verbindung zwischen Sekundärmetabolismus und hormoneller Kontrolle der Pflanzenentwicklung herstellt. Zunächst aber wurden beide AtPPTs funktionell charakterisiert.

3.1. Funktionelle Charakterisierung beider PPTs aus *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der deutlichen Homologien zu beschriebenen *PPT*-Genen und der Lokalisierung in der Plastidenhüllmembran (Fischer et al., 1997; Flügge, 1999), konnte davon ausgegangen werden, dass es sich auch bei den beiden PPTs aus *A. thaliana* um plastidär lokalisierte Proteine handelt. Die Funktion von Transportproteinen kann über Expression der entsprechenden cDNA in einem heterologen System wie Hefezellen charakterisiert werden (Flügge, 1998; Hanke et al., 1999). Nach Transformation der *AtPPT1*- und *AtPPT2*-pYES/NT2 Konstrukte in *S. cerevisiae* wurden positive Klone, die das entsprechende *PPT*-Gen exprimierten, selektiert (Abb. 3.1.1) und die rekombinanten Proteine für Transportmessungen zur Bestimmung der Substratspezifitäten von AtPPT1 und AtPPT2 eingesetzt.

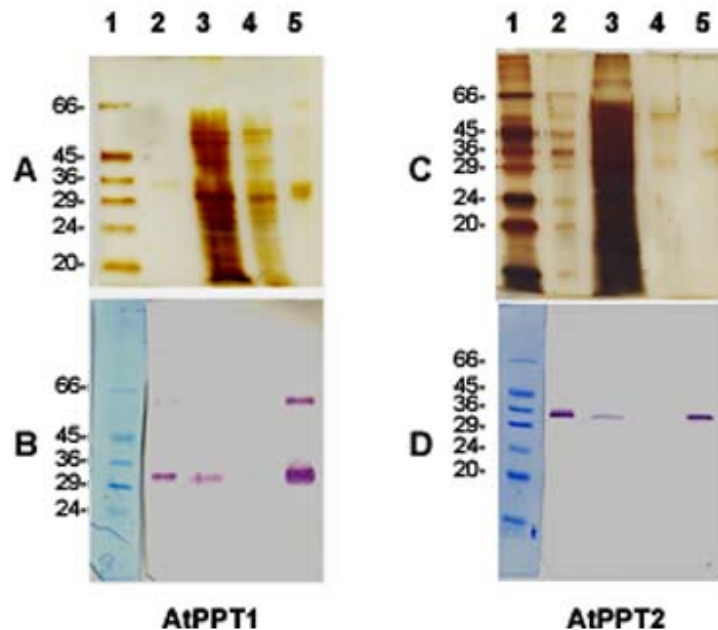


Abb. 3.1.1: Expression des *AtPPT1* und des *AtPPT2* in *S. cerevisiae*
 A und C: SDS-Polyacrylamidgele nach Silberfärbung; Größenangaben in kD
 B und D: Western-Blot; Detektion mit Anti-His-Antikörper; Größenangaben in kD
 (1) Marker (2) Positivkontrolle (*AtGPT1*) (3) Durchlauf (4) Waschschrift (5) Elution

Die Bestimmung von Transportraten mit Hefe-Gesamtmembranfraktionen und gereinigten PPT-Proteinen unterschied sich nicht. Daher erfolgten die weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der Substratspezifitäten mit Gesamtmembranprotein der transgenen Hefezellen. Dadurch konnten Proteinverluste während der Aufreinigung vermieden werden.

Wie aus einem Vergleich der Substratspezifitäten von *AtPPT1* und *AtPPT2* zu entnehmen ist (Abb. 3.1.2), handelt es sich bei beiden Translokatoren aus *A. thaliana* um funktionelle PEP-Transporter. *AtPPT1* und *AtPPT2* weisen ähnliche Substratspezifitäten auf und transportieren im Austausch von P_a neben PEP auch 2-PGA. 3-PGA wird von beiden PPTs aus *A. thaliana* sowie vom PPT aus Blumenkohl kaum transportiert und ist als physiologisches Gegentauchsubstrat weniger geeignet. Als Substrat scheint PEP von *AtPPT2* mit einer relativen Transportrate von 81% besser akzeptiert zu werden, als von *AtPPT1* mit einer Rate von nur 49%.

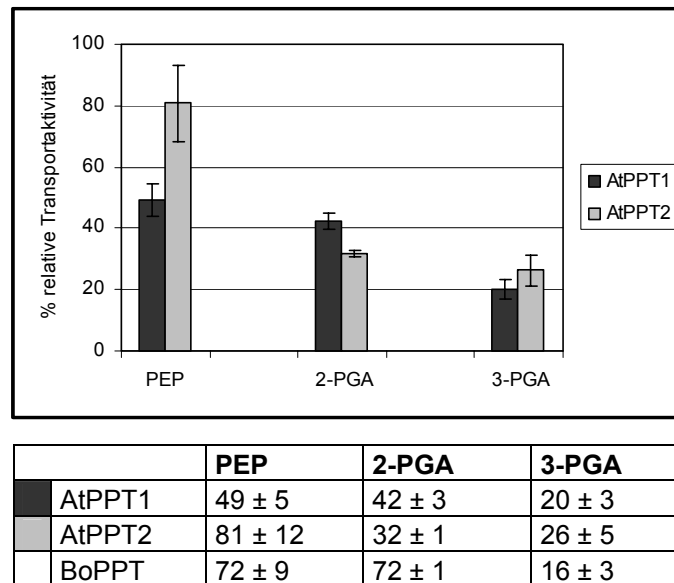


Abb. 3.1.2: Transporteigenschaften der AtPPTs

Als Austauschsubstrate wurden PEP, 2-PGA und 3-PGA verwendet. Die Transportkapazität für P_a wurde gleich 100% gesetzt. $n=4$

100%-Aktivitäten der rekombinanten Proteine (nmol/mg Protein/min): 3,6 (AtPPT1) und 0,7 (AtPPT2)

Die Tabelle enthält die Substratspezifitäten der AtPPTs im Vergleich zum gereinigten PPT aus Blumenkohl (BoPPT; Fischer et al., 1997).

3.2. *Cue1* weist ein deutlich verringertes Wurzelwachstum auf

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei starke *cue1*-Allele für die Untersuchungen herangezogen, *cue1-1* und *cue1-6*. Das *cue1-1* Allel befindet sich im genetischen Hintergrund der transgenen Linie pOCA108 (Ökotyp Bensheim R002), während *cue1-6* eine Mutante des Ökotyps Colombia (Col-0) ist (Tab. 2.2). Bei *cue1-1* handelt es sich um eine durch γ -Strahlen erzeugte Mutante, bei der ein Teil des Chromosoms V deletiert ist (Streatfield et al., 1999). Bei *cue1-6* wurde durch chemische Mutagenese mit EMS ein Translationsstop an der Position 54 der Präsequenz erzeugt (Streatfield et al., 1999), so dass das reife AtPPT1-Protein fehlt, aber die mRNA nachweisbar bleibt.

Neben des in *cue1-1* und *cue1-6* im Vergleich zu den Kontrollen verlangsamten vegetativen und reproduktiven Wachstums (Voll et al., 2003), wies auch die Wurzelentwicklung in den Mutanten eine deutliche Beeinträchtigung auf. Dieser Aspekt eines veränderten Wurzelphänotyps wurde bislang nur unzureichend charakterisiert und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit daher näher analysiert werden. Wie Abbildung 3.2.1 zeigt, weisen beide *cue1*-Allele ein deutlich verringertes Wurzelwachstum gegenüber

den entsprechenden Wildtypkontrollen auf. Diese Retardierung ist im *cue1-1*-Allel besonders ausgeprägt.

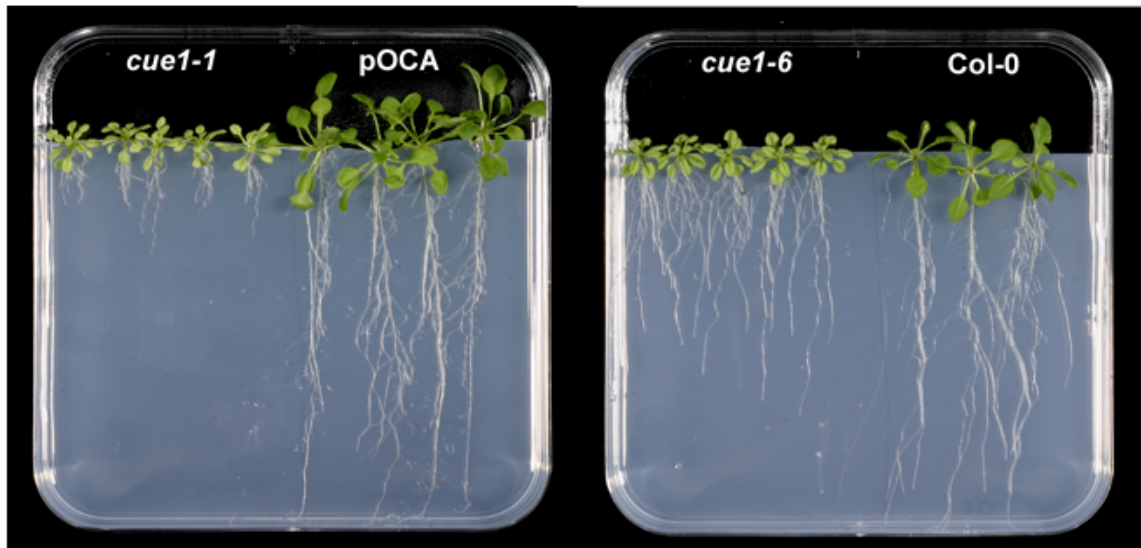


Abb. 3.2.1: Vergleich des Wurzelwachstums in den *cue1*-Mutanten und Kontrollen. Die Anzucht erfolgte für 24 Tage auf MS.

3.3. Der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutante kann durch Fütterung mit aromatischen Aminosäuren transient revertiert werden.

Von Streatfield et al. (1999) konnte bereits gezeigt werden, dass *cue1*-Mutanten, die in Gegenwart aller drei aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) angezogen wurden, den retikulierten Phänotyp nicht mehr ausprägen. Dies unterstützte die Hypothese, dass die eingeschränkte Syntheseleistung aromatischer AS und davon abgeleiteter Sekundärmetabolite in einer direkten kausalen Beziehung zu der beeinträchtigten Entwicklung der *cue1*-Mutante stehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine transiente Reversion des *cue1* Phänotyps bei weiter entwickelten Pflanzen (3-4 Wochen) möglich ist.

Die Anzucht der Mutanten erfolgte zunächst für 3-4 Wochen auf MS-Agar. Dann wurden die Mutanten auf MS-Agar, dem eine Mischung aus je 2 mM Tyrosin, Tryptophan und

Phenylalanin zugefügt wurde, umgesetzt. Nach ca. 7 Tagen Fütterung konnte der retikulierte Blattphänotyp der Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* revertiert werden (Abb. 3.3.1). Durch Anzucht der *cue1*-Mutanten in Gegenwart von nur einer der drei Aminosäuren konnte keine Reversion des Phänotyps erreicht werden (nicht gezeigt).

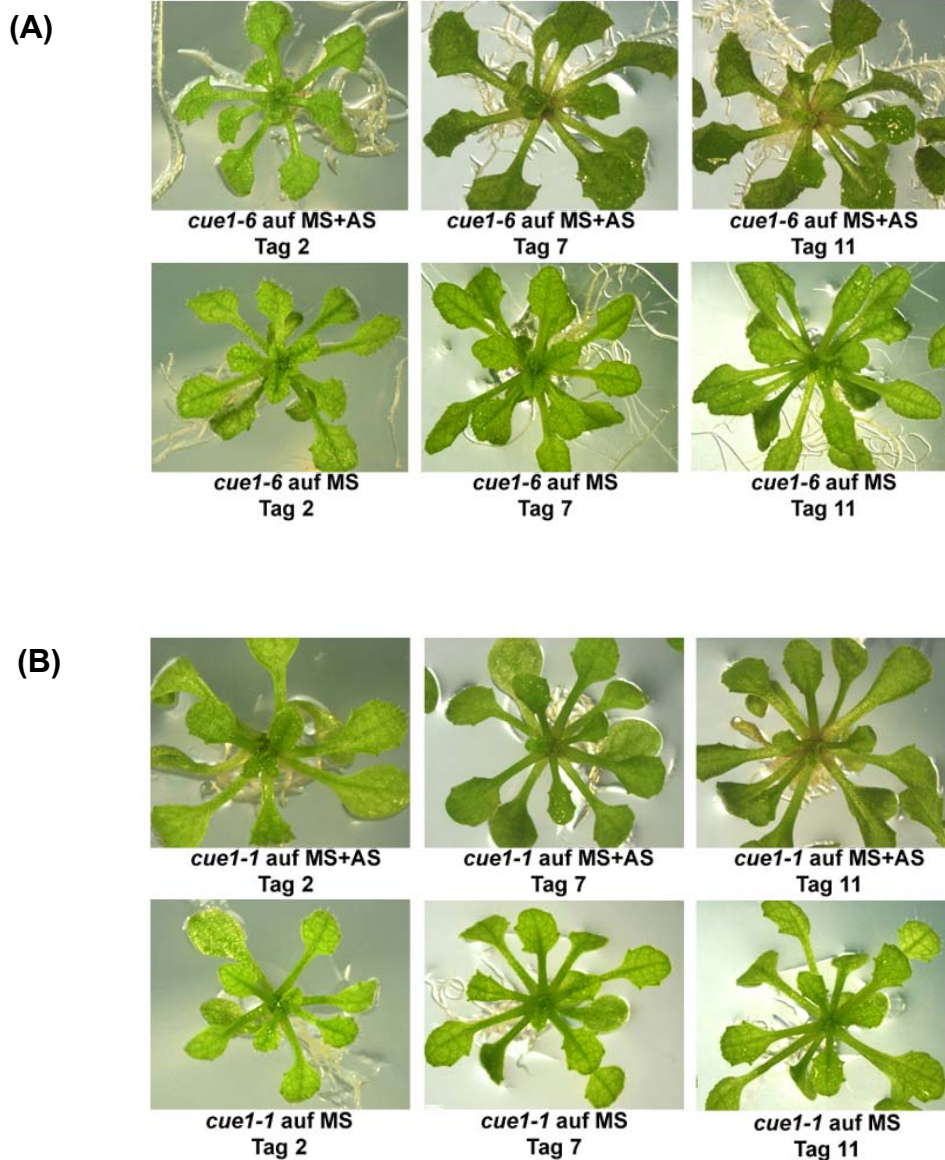


Abb. 3.3.1: Transiente Fütterung der *cue1-1* (A) und *cue1-6* (B) Mutanten mit einem Cocktail aus je 2 mM Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin (MS+AS). Die Anzucht der Kontrollen erfolgte auf MS ohne Zusatz aromatischer Aminosäuren.

3.4. Der *cue1*-Blattphänotyp wird durch Fütterung mit einem Neolignan-Glukosid (DCG) revertiert.

Der Befund, den *cue1* Phänotyp transient durch Fütterung mit aromatischen Aminosäuren revertieren zu können (s. 3.3), eröffnete die Möglichkeit, weitere Substanzen auf eine ähnliche Wirkung zu testen.

In Tabakpflanzen wurde bei der Blockade von MYB-Transkriptionsfaktoren durch die Überexpression heterologer MYB-Paraloge aus *Antirrhinum majus* ebenfalls ein retikulierter Blattphänotyp mit dunklen leitbündelnahen Bereichen und hellen Interkostalfeldern beobachtet (Tamagnone et al., 1998a). Durch die eingeschränkte Funktionalität der endogenen MYB-Faktoren, kam es in den transgenen Tabaklinien zu einer transkriptionellen Repression einiger Gene aus dem Phenylpropanstoffwechsel. In Zellkulturen dieser transgenen Tabakpflanzen konnte das abnorme Wachstum durch externe Zugabe von Dehydrodiconiferylalkoholglukosid (DCG) revertiert werden. So könnte ein Mangel an DCG auch als mögliche Ursache für die aberrante Blattmorphologie der *cue1*-Mutanten in Erwägung gezogen werden, zumal es sich bei DCG als Neolignan-Glukosid um ein Derivat des Phenylpropanstoffwechsels handelt (Abb. 3.4.1) und eine Beeinträchtigung in der Produktion dieser Substanz in den *cue1*-Mutanten zu vermuten ist.

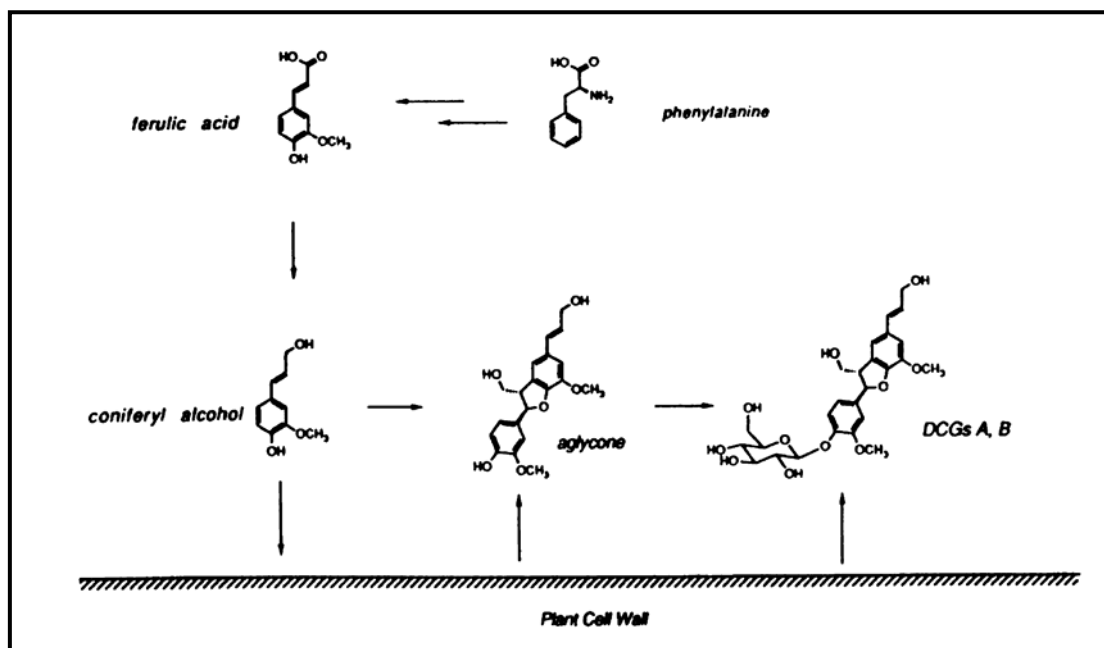


Abb. 3.4.1: Mögliche Synthesewege von Dehydrodiconiferylalkoholglukosid (DCG) (Orr und Lynn, 1991)

Für diese Versuche wurden Pflanzen der Linie *cue1-1* auf MS-Medium unter Langtag-Bedingungen angezogen (s. 2.2.3) und nach 3-4 Wochen auf frisches MS-Medium transferiert, das zuvor mit 20 μ M DCG versetzt wurde (s. 2.2.6). In dieser Versuchsserie wurde keine Reversion des *cue1*-Phänotyps beobachtet. Dieser Befund legte die Vermutung nahe, dass DCG nicht über die Wurzel aufgenommen und in den Spross transportiert werden kann.

In weiteren Experimenten wurde vor dem Transfer der Pflanzen auf DCG-haltiges Medium mit einem Skalpell die Wurzel entfernt und nur die Rosette in das Medium gesetzt. Nach 5 Tagen zeigten die sich neu entwickelten Blätter in *cue1-1* keinen retikulierten Phänotyp mehr, nach 9 Tagen wurde eine komplette Reversion des Phänotyps festgestellt (Abb. 3.4.2). Das Entfernen der Wurzel vor dem Transfer auf MS (-/+ DCG) löste in den Pflanzen Stressreaktionen aus, so dass im Sprossbereich eine erhöhte Anthocyanakkumulation zu beobachten war.

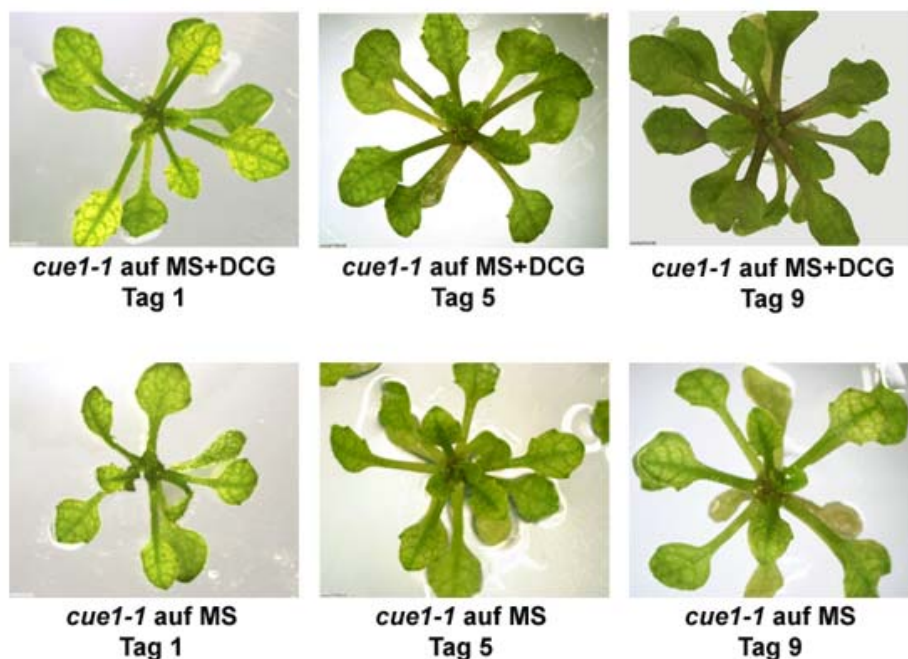


Abb. 3.4.2: Fütterung der *cue1-1*-Mutanten mit 20 μ M Dehydrodiconiferylalcoholglukosid (MS+DCG) im Vergleich zur Kontrolle (MS)

Nachdem die Pflanzen länger als 10 Tage in Gegenwart von DCG angezogen wurden, zeigten die neu entwickelten Blätter wieder den retikulierten Phänotyp. Diese Beobachtung

korrelierte mit der Ausbildung von Adventivwurzeln nach Wundverschluss. Nach wiederholtem Entfernen der Wurzeln und Umsetzen dieser Pflanzen auf frisches DCG-haltiges Medium, trat erneut nach ca. 4 Tagen wieder eine transiente Reversion des *cue1*-Phänotyps in den Mutanten auf (nicht gezeigt).

Ein ähnlich deutlicher Effekt auf den Phänotyp konnte weder mit DCA (dem Aglykon von DCG), noch der weiter stromaufwärts liegenden Vorstufe Coniferylalkohol (CA) erzielt werden (nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Synthese von DCG aus den Vorstufen sehr langsam, oder nur auf spezifische Zelltypen beschränkt.

3.5. Pfropfungen von *A. thaliana cue1*- und Wildtyp-Keimlingen

Der AtPPT2-Promotor ist in grünen Geweben ubiquitär und in der Wurzel nicht aktiv, während die Aktivität des AtPPT1-Promotors auf die in den Mutanten unbeeinträchtigten leitbündelnahen Bereiche beschränkt ist (Knappe et al., 2003). Daher wurde vermutet, dass AtPPT1 in die Produktion eines von PEP abgeleiteten potentiellen Signalmetaboliten eingebunden ist, der die Entwicklung des Mesophyllgewebes steuert. Eine zu überprüfende Hypothese ist, dass dieser putative Signalmetabolit im Xylemparenchym der Wurzel generiert wird, nach Abgabe in die Leitelemente des Xylems über den Transpirationsstrom in den Spross gelangt und dort seine Wirkung erfüllt. Diese Hypothese wurde durch Pfropfungsexperimente überprüft, die von Dr. Alexander Christmann (TU München) in zwei unabhängigen Versuchsserien durchgeführt wurden. Hierbei wurden im frühen Keimlingsstadium Sprosse von *cue1* auf die Wurzeln der Kontrolle (Abb. 3.5.1), bzw. Sprosse von pOCA auf die Wurzeln der *cue1*-Mutante (Abb. 3.5.2) gepfropft.

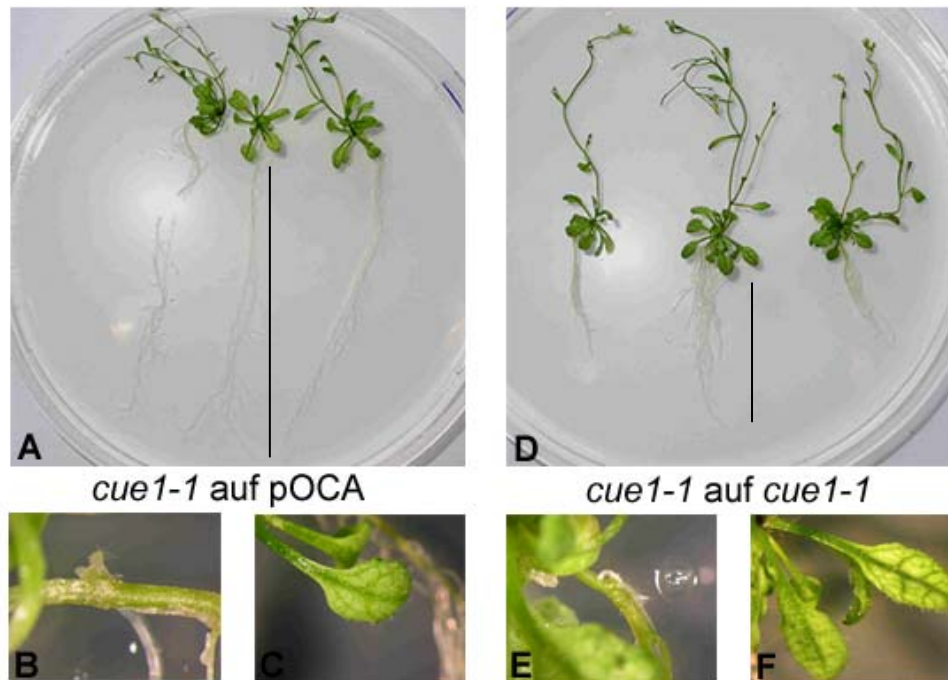


Abb. 3.5.1: *cue1-1* Rosette auf pOCA Wurzel (A-C) und Kontrolle (D-F); 4 Monate nach Pfropfung (durchgeführt von Dr. A. Christmann, TU München)

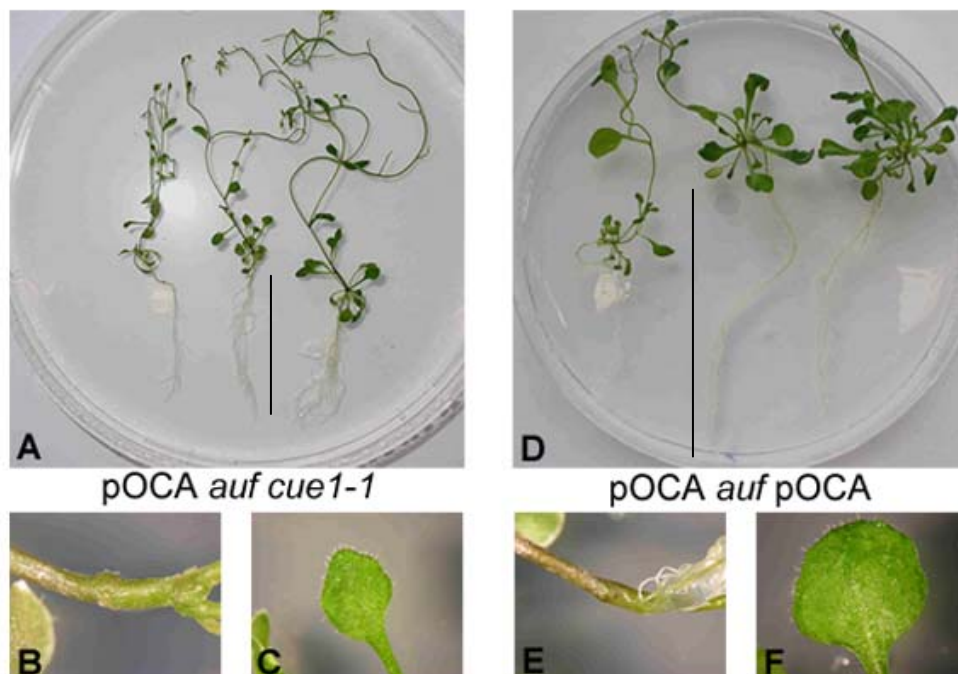


Abb. 3.5.2: pOCA Rosette auf *cue1-1* Wurzel (A-C) und Kontrolle (D-F); 4 Monate nach Pfropfung (durchgeführt von Dr. A. Christmann, TU München)

Abbildung 3.5.1 zeigt, dass der Phänotyp der *cue1*-Mutante nicht durch Pfropfung des *cue1-1* Keimlings auf pOCA Wurzel (Abb. 3.5.1 B) aufgehoben werden konnte. Es sind keine Änderungen im Blattphänotyp der Mutante zu erkennen (Abb. 3.5.1 C). Der Kontakt zur pOCA Wurzel hat also trotz früher Pfropfung im Keimlingsstadium keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Mesophylls in den *cue1-1* Blättern. Es wurden auch keine Effekte hinsichtlich der Wurzellänge der Pflanzen festgestellt (Abb. 3.5.1 A und D). Die Retardierung des Wachstums der *cue1*-Mutante spiegelt sich auch in einer Verkürzung der Wurzel wieder (Abb. 3.5.1 D). Die Wurzel der gepfropften Pflanze (Abb. 3.5.1. A), bei der es sich ursprünglich um eine pOCA Wurzel handelte, zeigte aber eine normale Entwicklung. Durch die Pfropfung der *cue1-1* Rosette wurde die Entwicklung der pOCA Wurzel also nicht beeinträchtigt. Ein ähnliches Bild zeigte die Pfropfung in umgekehrter Richtung (Abb. 3.5.2). Bei der Konstellation pOCA Rosette auf *cue1-1* Wurzel (Abb. 3.5.2. A) waren die Wurzeln sehr kurz und mit den Wurzeln der *cue1-1*-Mutante in Abbildung 3.5.1 D vergleichbar. Leichte Veränderungen waren allerdings bei der pOCA Rosette zu beobachten. Der Spross erschien länger und dünner im Vergleich zur Rosette im Kontrollexperiment (Abb. 3.5.2. D), doch Auswirkungen auf den Blattphänotyp waren auch hier nicht zu beobachten. Der Kontakt zur *cue1-1* Wurzel hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung des Mesophylls im pOCA Blatt (Abb. 3.5.2. C), so dass keine Ansätze eines retikulierten Blattphänotyps festgestellt wurden.

Diese Ergebnisse haben somit die Hypothese, dass ein potentiell Signal-molekül aus dem Phenylpropanstoffwechsel für die Steuerung der Mesophyllentwicklung der *cue1*-Mutante im Wurzelparenchym generiert und dann durch den Spross in die Blätter transportiert wird, widerlegt. Durch die Pfropfungen konnte keine Kommunikation zwischen Spross und Wurzel festgestellt werden.

3.6 Cytokinine revertieren den retikulierten Phänotyp der *cue1*-Mutanten

DCG kann unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei Verarmung an endogenen Cytokinen, deren Wirkung partiell substituieren (Orr und Lynn, 1992; Teutonico et al., 1991). Auf der Basis des Befundes, dass DCG in der Lage ist, den *cue1* Phänotyp biochemisch zu komplementieren, wurde überprüft, ob nach Fütterung von trans-Zeatin eine ähnliche Wirkung erzielt werden kann.

Die transienten Fütterungen mit Cytokinin erfolgten durch Umsetzen der für 2-3 Wochen steril angezogenen intakten Pflanzen auf MS-Agar, dem 1 μ M trans-Zeatin zugesetzt wurde. Abbildung 3.6.1 zeigt, dass nach 7-tägiger Anzucht der Mutanten auf Zeatin ein Rückgang des retikulierten Phänotyps zu beobachten war, nach weiteren 4 Tagen zeigte *cue1-1* einen Wildtyp-ähnlichen Blattphänotyp.

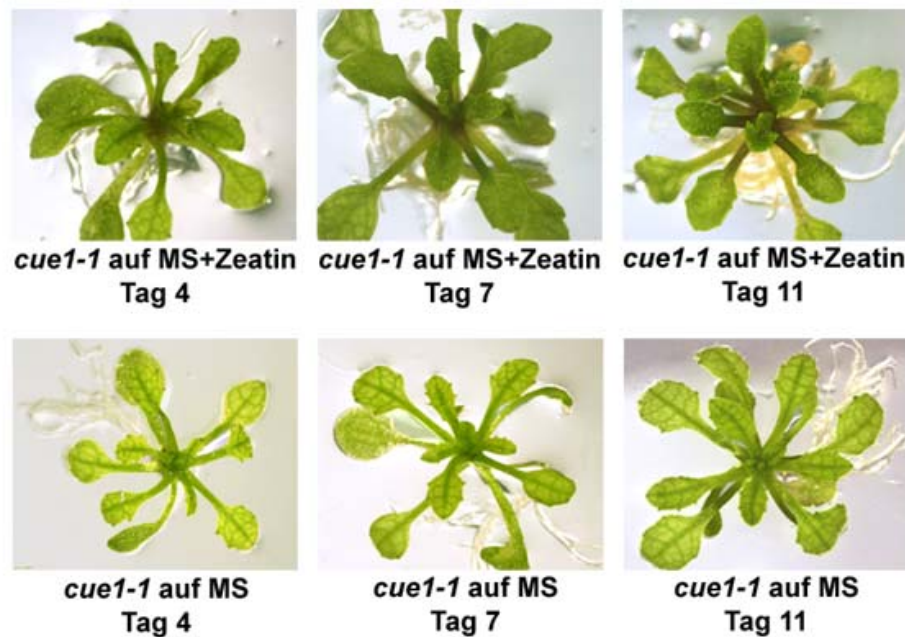


Abb. 3.6.1: Fütterung der *cue1-1*-Mutanten mit 1 μ M trans-Zeatin im Vergleich zur Kontrolle (MS)

Durch Zugabe von hohen Konzentrationen an Kinetin, das im Vergleich zu trans-Zeatin eine weitaus geringere Wirksamkeit hat, konnte der retikulierte Phänotyp ebenfalls kuriert werden (nicht gezeigt). Die Behandlung mit steigenden Kinetin-Konzentrationen führte aber auch zu erhöhten Beeinträchtigungen im Wachstum der Mutanten. Die mit 10 μ M Kinetin gefütterten Mutanten verloren zwar den retikulierten Phänotyp, waren aber extrem im Wachstum retardiert.

Um weitere Aussagen über eine mögliche Rolle von Cytokinin in der Mutante bei der Ausbildung des *cue1*-Phänotyps treffen zu können, wurden die Gehalte dieser Phytohormone in Blatt und Wurzel von *cue1-1*, *cue1-6* sowie in den Kontrollen pOCA und Col-0 bestimmt (s. 3.7).

3.7 Die Gehalte an Cytokinin in der *cue1*-Mutante und in Kontrolllinien

Die Bestimmung der Gehalte an Cytokinin in Blättern und Wurzeln von *cue1-1*, *cue1-6*, pOCA und Col-0 erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Miroslav Strnad (Institut für experimentelle Botanik, Palacký Universität, Olomouc, Tschechien). In den *cue1*-Mutanten wurden höhere Gehalte an Cytokinin, vor allem in der Wurzel, gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen (Abb. 3.7.1). Die Gehalte der unterschiedlichen Cytokinine in pmol/g FW sind im Anhang (8.2) zu finden. Abbildung 3.7.1 zeigt eine Aufstellung der gemessenen Cytokiningehalte in *cue1-1* und *cue1-6* Blattrosetten sowie *cue1* Wurzel als prozentuale Anteile der Gehalte im Wildtyp. Vor allem in den Wurzeln der Mutanten war der Cytokiningehalt signifikant (z. T. mehr als zweifach) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Für einige Cytokinine wie cZOG, tZROG, cZROG, dHZROG, cZR-5'MP, dHZR-5'MP und iPR-5'MP war der Gehalt sowohl in der Rosette als auch in der Wurzel der *cue1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, z. B. dHZROG um 332% in *cue1-1* Rosetten und 404% in *cue1*-Wurzeln. Die Gehalte an Kinetin und trans-Zeatin waren in der Mutante unterschiedlich verteilt. In Rosetten von *cue1-1* und *cue1-6* wurden für Kinetin erhöhte Werte detektiert, während der Gehalt in der *cue1*-Wurzel um ca. 70% im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt war. Dagegen wurden in den Wurzeln der *cue1*-Mutante stark erhöhte Gehalte an trans-Zeatin nachgewiesen (221% Anteil am Wt-Gehalt). In *cue1-6* Rosetten war der Gehalt an trans-Zeatin gegenüber Col-0 leicht erhöht (117%), in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA jedoch um ca. 20% herabgesetzt (79%).

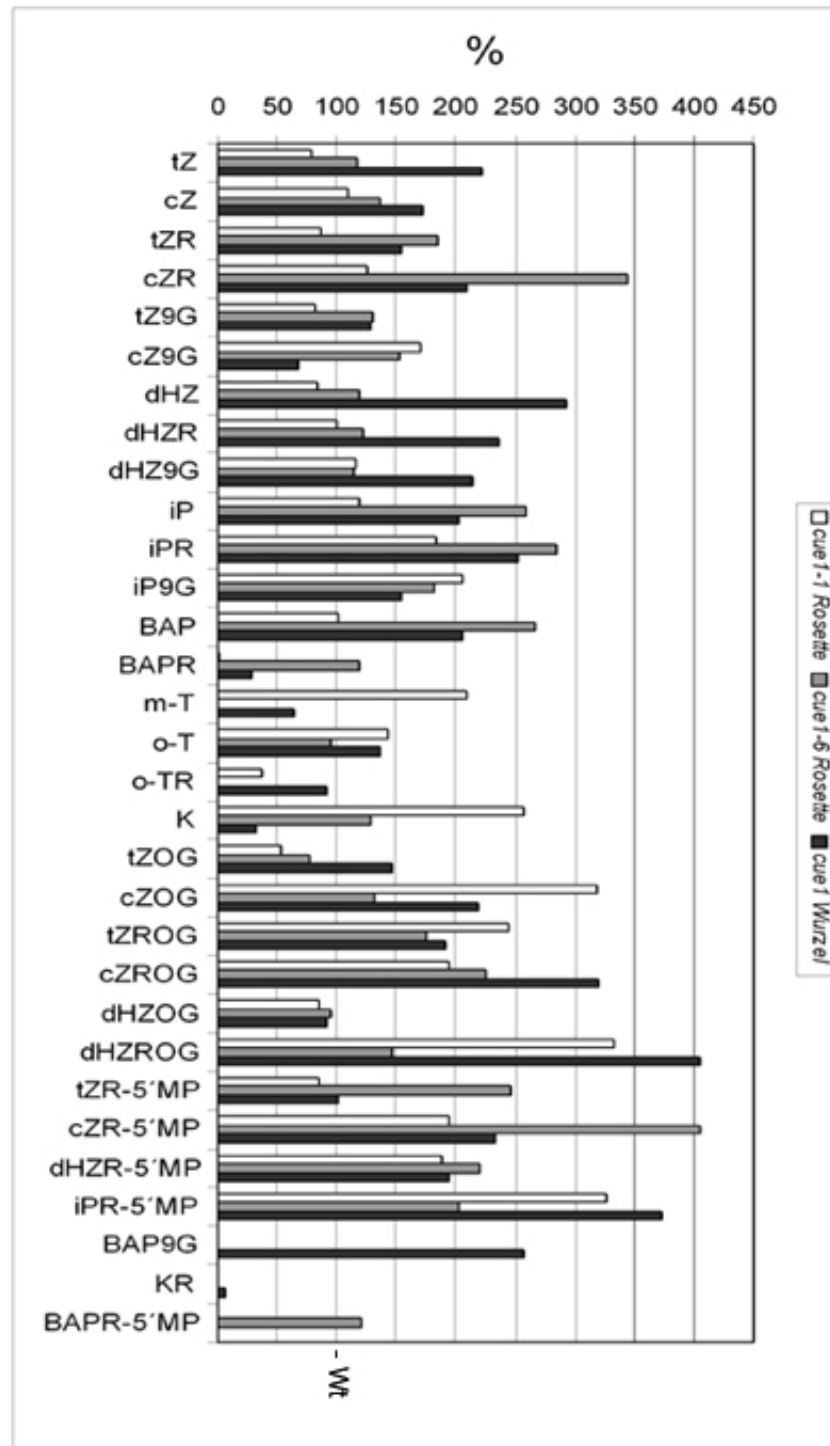


Abb. 3.7.1: Cytokiningehalte in der *cue1*-Mutante als prozentuale Anteile der Gehalte im Wildtyp

tZ: trans-Zeatin; cZ: cis-Zeatin; tZR: tZ-Ribosid; cZR: cZ-Ribosid; tZ9G: tZ-9-Glukosid; cZ9G: cZ-9-Glukosid; dHZ: dehydro-Zeatin; dHZR: dHZ-Ribosid; dHZ9G: dHZ-9-Glukosid; iP: Isopentenyladenin; iPR: iP-Ribosid; iP9G: iP-9-Glukosid; BAP: 6' Benzylaminopurin; BAPR: BAP-Ribosid; m-T: meta-Topolin; o-T: ortho-Topolin; o-TR: o-T-Ribosid; K: Kinetin; tZOG: O-glucosyl-tZ; cZOG: O-glucosyl-cZ; tZROG: O-glucosyl-tZ-Ribosid; cZROG: O-glucosyl-cZ-Ribosid; dHZOG: O-glucosyl-dHZ; dHZROG: O-glucosyl-dHZ-Ribosid; tZR-5'MP: tZR-5'monophosphat; cZR-5'MP: cZR-5'monophosphat; dHZR-5'MP: dHZR-5'monophosphat; iPR-5'MP: iPR-5'monophosphat; BAP9G: BAP-9-Glukosid; KR: Kinetinribosid; BAPR-5'MP: BAPR-5'monophosphat

3.8. Fütterung der *cue1*-Mutanten mit Auxin

Da der retikulierte *cue1*-Phänotyp durch Fütterung mit DCG und Cytokinen wie Zeatin und Kinetin kuriert werden konnte, wurde auch Auxin als weiteres Phytohormon in Fütterungsexperimenten eingesetzt. Als aromatische Aminosäure geht Tryptophan in die Auxin-Synthese ein, so dass, im Gegensatz zu Cytokinin, eine direkte Verbindung zum durch PEP gespeisten Shikimatweg hergestellt werden kann.

Durch externe Zugabe des Auxins NAA (Naphthyllessigsäure) mit einer Konzentration von 1 μM konnte der retikulierte Blattphänotyp der *cue1-1*-Mutante nicht revertiert werden (Abb. 3.8.1). Dies konnte bei Fütterung von *cue1*-Mutanten und Kontrollen, deren Wurzeln vor dem Transfer auf NAA-haltiges Medium entfernt wurden (hier nicht gezeigt), als auch in den intakten Pflanzen beobachtet werden (siehe Abb. 3.8.1). Auch durch Zusatz einer höheren NAA-Konzentration (10 μM) zum MS-Agar, wurde keine Reversion des retikulierten Phänotyps erreicht (nicht gezeigt).

Die Fütterungsexperimente zeigten, dass durch die externe Zugabe von NAA ein verstärktes Wachstum der Seitenwurzeln hervorgerufen wurde. Durch die Verstärkung des Lateralwurzelwachstums, als eine von vielen Funktionen von Auxin bekannt, erschienen die Wurzeln durch das geringe Längenwachstum in der *cue1*-Mutante leicht buschig. Durch Fütterung mit 10 μM wurde dieser Effekt noch verstärkt.

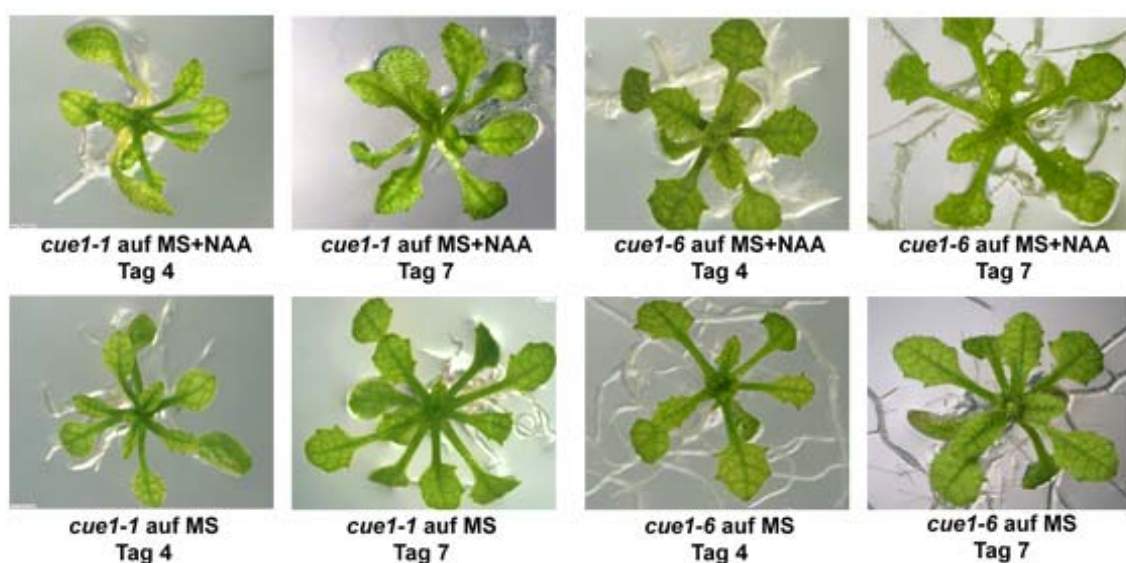


Abb. 3.8.1: Anzucht der *cue1*-Mutanten auf MS, supplementiert mit 1 μM NAA, im Vergleich zu Kontrolllinien (MS)

Um weitere Überlegungen über eine mögliche Rolle von Auxinen anstellen zu können, wären Informationen über die Gehalte verschiedener Auxine in Blatt und Wurzel der *cue1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hilfreich. Leider waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch keine entsprechenden Messwerte verfügbar.

3.9 Induzierbares RNAi für *AtPPT1* im Wildtyp-Hintergrund

Für genomweite Expressionsanalysen sollte *AtPPT1* mit Hilfe eines induzierbaren Promotorsystems transient über RNAi reprimiert werden. Hierzu wurde das durch Ethanol induzierbare *alcR-alcA* Promotorsystem der Firma Syngenta eingesetzt. Vor der Entwicklung dieses induzierbaren Zweikomponentensystems, wurde die Funktionalität des verwendeten RNAi-Konstruktes im folgenden Versuchsansatz (3.9.1) getestet.

3.9.1 Entwicklung des retikulierten *cue1*-Blattphänotyps durch konstitutive Expression des *AtPPT1*-RNAi-Konstrukts

Um zu überprüfen, ob das Herabsetzen der *AtPPT1*-RNA im Wildtyp-Hintergrund eine Entwicklung des retikulierten *cue1*-Blattphänotyps zur Folge hat, wurde ein RNAi-Konstrukt für *PPT1* (Abb. 3.9.1.1) unter die Kontrolle des CaMV35S-Promotors gestellt und in Col-0 Pflanzen exprimiert. Die selektierten, das RNAi-Konstrukt tragenden, Col-0/35S:*PPT1*-RNAi Linien zeigten einen *cue1*-ähnlichen retikulierten Blattphänotyp, der aber nicht in der gesamten Blattrosette ausgeprägt war (Abb. 3.9.1.2). Vor allem die älteren Blätter zeigten eine dunkelgrüne Färbung in der gesamten Lamina.

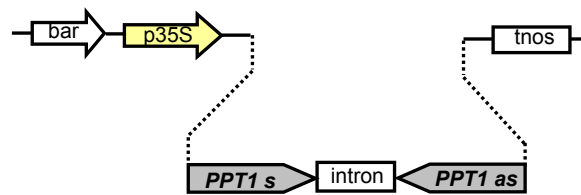


Abb. 3.9.1.1: Schematische Darstellung des RNAi-Konstruktes für *AtPPT1*

PPT1 wurde in *sense* (*s*) und *antisense* (*as*) Orientierung in den Vektor pKannibal (s. Anhang 8.3) kloniert, wo es ein Intron von ca. 800 bp flankiert. Als Transformationsvektor diente pGreenII mit einem 35S-Promotor, nos-Terminator (tnos) und einer BASTA®-Resistenz (*bar*) zur Selektion positiver Transformanten

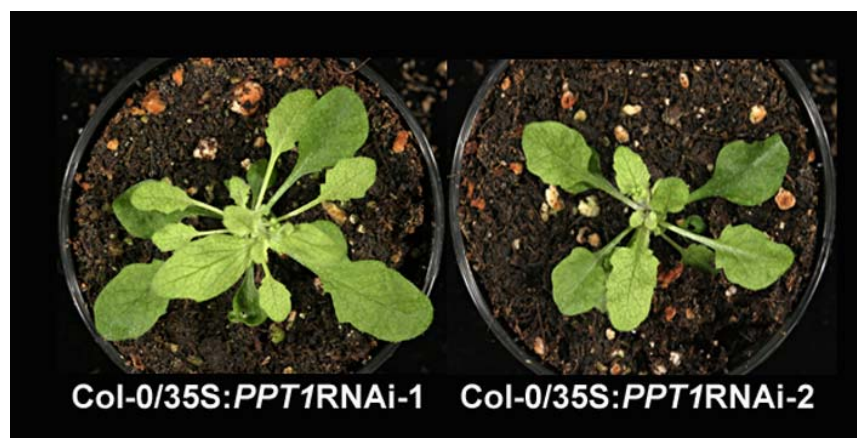


Abb. 3.9.1.2: Entwicklung eines retikulierten Blattphänotyps in den Col-0/35S:*AtPPT1*-RNAi Linien

3.9.2 Die Generierung Ethanol-induzierbarer *AtPPT1*-RNAi Pflanzen im Col-0 Hintergrund

Das *alcR-alcA* Promotorsystem basiert auf der Eigenschaft des *alcRepressors* (*alcR*), sich in Gegenwart von Ethanol vom *alcA*-Promotor abzulösen. In den erzeugten Konstrukten befindet sich das transient zu exprimierende *AtPPT1*-RNAi-Konstrukt unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors, während der *alcR*-Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert wird (Abb. 3.9.2.1). Letztere Sequenz wurde zuerst in den Transformationsvektor pGreenII mit einer BASTA® Resistenz für die Selektion der transformierten Pflanzen kloniert, der zuvor durch Entfernen einer *HindIII*-Schnittstelle modifiziert wurde. Das *alcA-PPT1*-RNAi-Konstrukt wurde dann ebenfalls in diesen Vektor

eingebraucht. Die schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist im Anhang aufgeführt (8.3). Anzucht und Induktion der mit diesem Vektor transformierten und selektierten Col-0 Nachkommen erfolgten auf MS-Platten. Nach Anzucht der Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien für ca. 2-3 Wochen wurden die jungen Pflanzen auf frisches MS-Medium umgesetzt, das kurz vor dem Erstarren mit Ethanol supplementiert wurde (EtOH-Gehalt im Medium: 0,015%). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion wurden nach fotografischer Dokumentation der induzierten Pflanzen und Kontrollen (Abb. 3.9.2.2) Proben entnommen und über RT-PCR die Intensität des *PPTI*-Signals nachgewiesen (Abb. 3.9.2.3). Nach 168-stündiger Anzucht auf Ethanol war die Ausprägung eines retikulierten Blattphänotyps erkennbar (Abb. 3.9.2.2 A). Anhand der Expressionsanalyse mittels RT-PCR konnte, wie erwartet, ein Rückgang in der *PPTI*-Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abb. 3.9.2.3).

Zu diesem Zeitpunkt wurde die Induktion abgebrochen und die induzierten Pflanzen auf frisches MS-Medium umgesetzt. Nach dem Entzug der Ethanol-Quelle wurden zu definierten Zeitpunkten zwischen 2 h und 120 h Blattproben entnommen und über RT-PCR analysiert, wann eine Erhöhung in der *PPTI*-Transkriptmenge zu beobachten ist. Nach 48 h konnte bereits ein stärkeres Signal für *PPTI* detektiert werden. Die neu entwickelten Blätter der Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Mutanten zeigten keinen retikulierten Phänotyp mehr (Abb. 3.9.2.2 B). Eine Ausweitung dieser Entwicklung auf weitere Rosettenblätter war nach 96 h zu beobachten (Abb. 3.9.2.2 C, D). Nach 120 h Ethanol-Entzug wurden wieder größere *PPTI*-Transkriptmengen in den transgenen Linien nachgewiesen (Abb. 3.9.2.3).

Um zu klären, welche Auswirkungen die Reversion des *knock-downs* des *PPTI* auf das Transkriptom der Mutanten hat, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt (s. 3.10.3). Dabei wurden die Zeitpunkte 168 h nach Ethanol-Induktion (Zeitpunkt 0) und 72 h sowie 120 h nach Ethanol-Entzug ausgewählt und mit der Kontrolle (Col-0/*alcA:PPTIRNAi*, nicht induziert) verglichen. Um mögliche Ethanol-spezifische Effekte auf die Genexpression zu berücksichtigen, wurden auf Ethanol angezogene Col-0 Kontrollen bei den Microarray-Analysen eingesetzt.

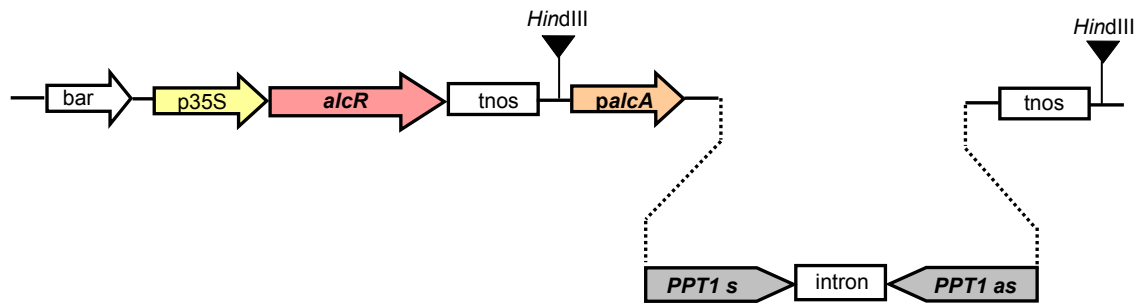


Abb. 3.9.2.1: Schematische Darstellung des induzierbaren RNAi-Systems für *PPT1*

Das *PPT1*RNAi-Konstrukt steht unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors (*palcA*). Dem *alcRepressor* (*alcR*) wird ein 35S-Promotor vorangestellt. Weitere Komponenten: Basta®-Resistenz (*bar*) und nos-Terminatoren (*tnos*). Die Klonierungsstrategie ist im Anhang (8.3) enthalten.

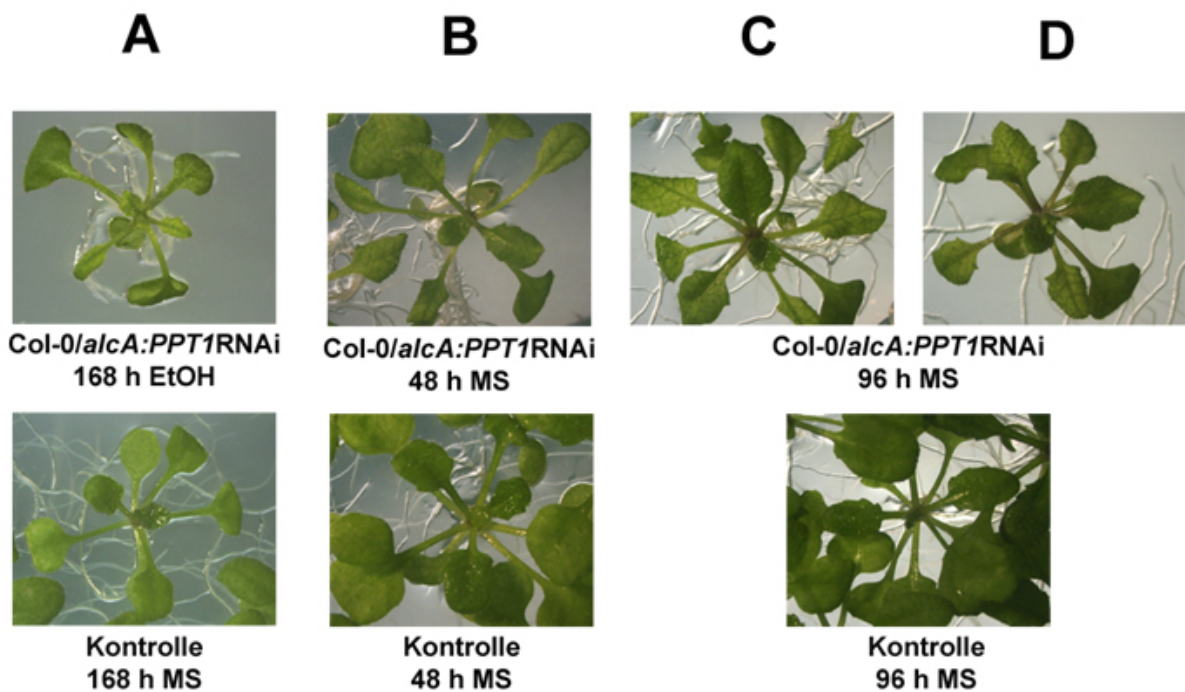


Abb. 3.9.2.2: Blattphänotyp der *Col-0/alcA:PPT1RNAi* Linien 168 h nach Ethanol-Induktion (A) und 48 h (B) sowie 96 h (C, D) nach Ethanol-Entzug im Vergleich zur Kontrolle (*Col-0/alcA:PPT1RNAi*; nicht induziert)

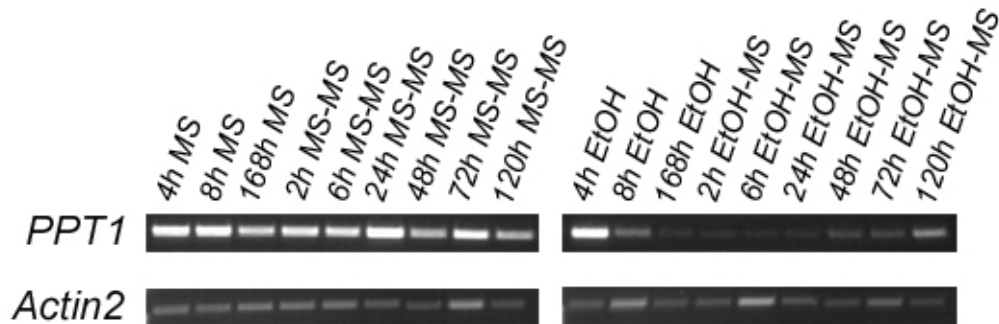


Abb. 3.9.2.3: RT-PCR-Nachweis der *PPT1*-Produkte bei Induktion (EtOH) und nach Abbruch der Induktion (EtOH-MS) im Vergleich zur Kontrolle (MS und MS-MS)

3.10. Die Suche nach „Kandidatengen“ mit Hilfe einer genomweiten Expressionsanalyse

3.10.1 Die Genexpression in Rosetten und Wurzeln der *cue1*-Mutante im Vergleich zur Kontrolle

Um festzustellen, welche Gene in der *cue1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp dereguliert sind, wurden Microarray-Analysen von *cue1-1* und pOCA Linien durchgeführt.

Abbildung 3.10.1.1 A zeigt ein Venn-Diagramm* der insgesamt deregulierten Gene in Blatt und Wurzel von *cue1-1* im Vergleich zu pOCA. Dabei ist ersichtlich, dass neben einer Reihe von Genen, deren Expression in *cue1-1* im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt war (1351 im Blatt und 363 in der Wurzel), auch viele Gene in *cue1-1* gegenüber pOCA hochreguliert waren (823 im Blatt und 265 in der Wurzel). Zusätzlich zeigten 182 Gene sowohl im Blatt als auch in der Wurzel veränderte Expressionsstärken. Abbildung 3.10.1.1 B zeigt die Anzahl der Gene, die mit einem Verhältnis von $\log_2 > 1$ < -1 in *cue1-1* stark dereguliert waren.

*benannt nach John Venn, englischer Mathematiker (Mengenlehre)

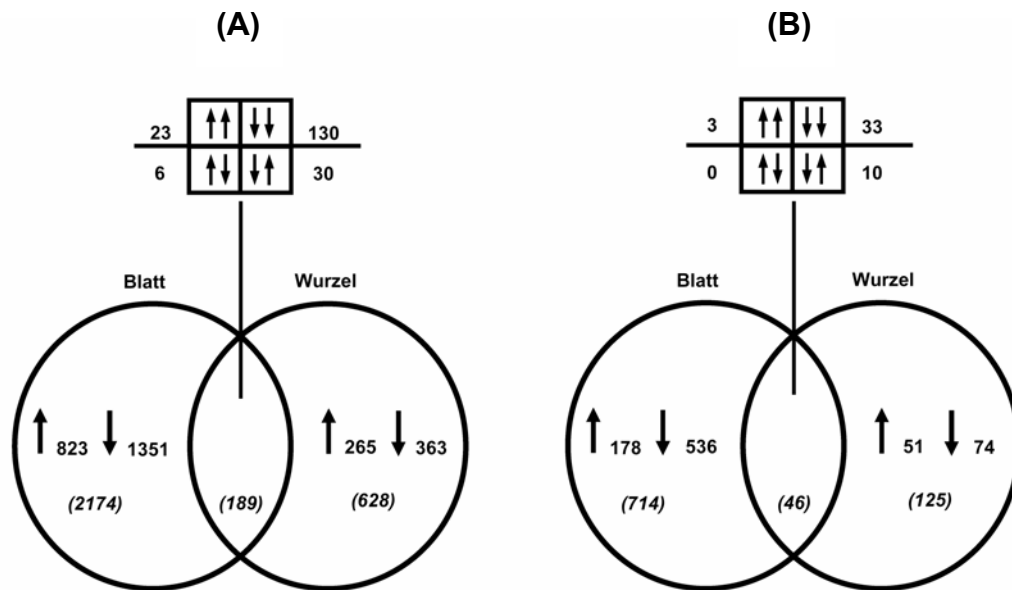


Abb. 3.10.1.1: Anzahl aller (A) und im Bereich von $\log_2 > 1 < -1$ (B) deregulierten Gene in *cue1-1* im Verhältnis zu pOCA

Alle im Verhältnis zu pOCA deregulierten Gene in Blatt und Wurzel von *cue1-1* wurden in unterschiedliche Funktionsbereiche wie Transport, Photosynthese, Stress, Entwicklung und Signaltransduktion, DNA- und RNA-Prozessierung, Transkriptionsregulation, Stoffwechsel von Phytohormonen, Proteinbiosynthese und -abbau sowie Zellorganisation eingeordnet (Tab. 3.10.1.1). Die Funktion von ca. 16% der betroffenen Gene ist unbekannt. Unter den Genen, deren Expression in *cue1-1* stark herabgesetzt war, befindet sich der *AtPPT1*, der mit einem Verhältnis von $\log_2 < -3$ relativ zum Wildtyp dereguliert war. Es waren auch fünf weitere Gene, die benachbart zum PPT1-Lokus auf Chromosom V liegen, stark dereguliert (Tab. 3.10.1.2). Aufgrund dieser Beobachtung wurde mittels PCR überprüft, ob in *cue1-1* Amplifikationsprodukte entsprechend dieser Gene nachzuweisen sind. Möglicherweise führte die Mutagenese durch γ -Bestrahlung nicht nur zu einem Funktionsverlust des PPT1, sondern auch zu Deletionen in weiteren, *PPT1*-benachbarten Genen. Abbildung 3.10.1.2 zeigt, dass für keines der fünf Gene in *cue1-1* ein Produkt amplifiziert werden konnte, während für pOCA ein entsprechendes Signal detektiert wurde. Wie vermutet, ist die DNA in den *PPT1*-benachbarten Bereichen, wie bei *PPT1* selbst, bei der Generierung der *cue1-1* Mutante zerstört worden.

Tab. 3.10.1.1: Anzahl der deregulierten Gene in Blatt und Wurzel von *cue1-1* im Verhältnis zu pOCA, sortiert nach Funktionsgruppen (**Teil 1**)

	Gesamt		Blatt		Gesamt		Wurzel		Gesamt		Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Energy and basic metabolism, transport	311		89	222	103		28	75	32		4	2	3			23		
transport	72		14	58	28		8	20	8		1					7		
PS light reaction	8			8	9		1	8	2			1				1		
mitochondrial electron transport	6		3	3	1			1										
TCA cycle	7		2	5	2			2										
Calvin cycle/OPP/photorepiration	5		2	3	5		2	3										
minor CHO metabolism	15		1	14	3			3	2		1					1		
major CHO metabolism	18		2	16	1			1										
glycolysis/gluconeogenesis	8		6	2	3		2	1	1							1		
C1-metabolism related	1		1															
Biodegradation of Xenobiotics	1			1														
lipid metabolism	32		8	24	26		5	21	4				1			3		
N-metabolism	5		2	3	1			1										
amino acid metabolism	42		18	24	5		2	3	5							5		
nucleotide metabolism	26		18	8					2				1			1		
S-assimilation	1		1						1		1					1		
secondary metabolism	61		10	51	16		6	10	6		1	1				4		
Co-factor and vitamins	2		1	1	1		1		1				1					
tetrapyrrole synthesis	1			1	2		1	1										
Stress response, environment	134		29	105	39		18	21	12		1	1	6			4		
redox regulation	16		4	12	9		3	6	1				1					
stress, biotic	59		1	58	19		11	8	6				3			3		
stress, abiotic	56		22	34	11		4	7	5		1	1	2			1		
stress	3		2	1														
Development and Signalling	201		44	157	55		25	30	23		2	1	4			16		
Development	53		14	39	25		14	11	11		1	1	2			7		
signalling	141		30	111	29		11	18	12		1		2			9		
metal handling	7			7	1			1										

Tab. 3.10.1.1: Anzahl der deregulierten Gene in Blatt und Wurzel von *cue1-1* im Verhältnis zu pOCA, sortiert nach Funktionsgruppen (**Teil 2**)

	Gesamt	Blatt	Wurzel	Gesamt	Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel
		↑	↓		↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Hormone metabolism	55	4	51	28	12	16	1	0	2	10		
salicylic acid				2		2						
jasmonate	5	1	4	3	2	1						1
gibberellin	3		3	4	2	2			1			2
ethylen	18		18	4	1	3						2
cytokinin	4	1	3	3	2	1						
brassinosteroid				1		1						
auxin	18	2	16	10	5	5	1		1	1		
abscisic acid	7		7	1		1					4	
DNA processing/Regulation of transcription	284	149	135	94	41	53	6	1	3	19		
DNA unspecified	14	9	5	2	2							
DNA synthesis	32	28	4	11	8	3	2		1	4		
DNA repair	7	4	3									
RNA processing	27	26	1	2	2							
RNA RNA Binding	8	8										
RNA transcription	3	2	1	1		1						
Regulation of transcription	193	72	121	78	29	49	4	1	2	15		
Protein turnover, modification	335	194	141	71	34	37	3	0	3	11		
protein synthesis	137	131	6	8	7	1	3					
protein targeting	13	8	5	7	1	6				3		
protein degradation	106	30	76	40	21	19			3			
protein posttranslational modification	68	14	54	12	3	9				3		
protein assembly aa activation	10	10		3	1	2						
protein folding	1	1		1	1							
Cell structure, organisation, cell cycle	84	29	55	25	9	16	1	0	1	6		
Cell organisation	16	5	11	2		2				1		
Cell division	3	1	2									
Cell cycle	9	8	1							1		
Cell vesicle transport	3	1	2	1		1						
Cell wall	53	14	39	22	9	13	1		1	4		
Miscellaneous/no ontology	412	148	264	121	50	71	4	0	5	21		
miscellaneous function	117	24	93	38	13	25			3			
P450	26		26	14	2	12	1			3		
Pentatricopeptid repeat proteins	19	17	2	1		1	1					
no ontology	250	107	143	68	35	33	2		2	15		
Expressed proteins/unknown	358	137	221	92	48	44	1	1	3	20		
Gesamt	2174	823	1351	628	265	363	23	6	30	130		

Tab. 3.10.1.2: Deregulierung (log2) von *AtPPT1* und benachbarten Genen in Blatt und Wurzel von *cue1-1* im Vergleich zu pOCA

Gen	Funktion	<i>cue1-1</i> Blatt	<i>cue1-1</i> Wurzel
At5g33290	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	-4,59	-4,41
At5g32440	DNA.synthesis/chromatin structure	-3,72	-3,08
At5g34853	DNA.synthesis/chromatin structure.retrotransposon/transposase	-3,52	-3,54
At5g32470	not assigned.unknown	-3,30	-3,30
At5g33280	transport.unspecified anions	-3,25	-2,01
At5g33320 = PPT1	transport.metabolite transporters at the envelope membrane	-3,10	-3,41

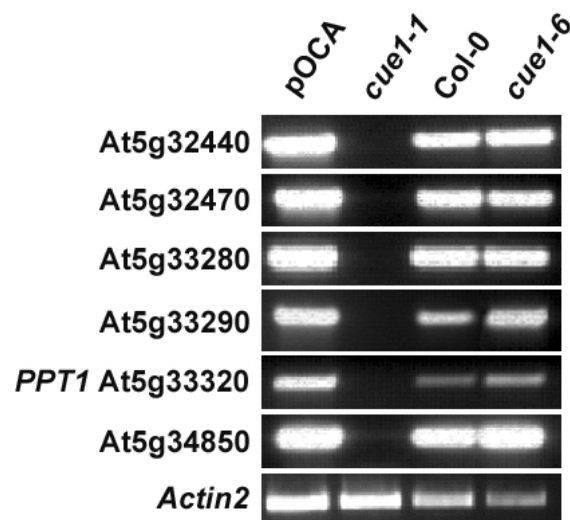


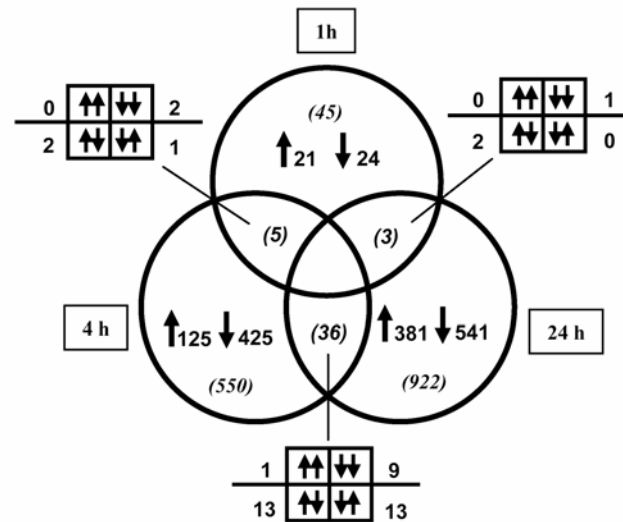
Abb. 3.10.1.2: Agarosegel einer PCR mit genomischer DNA: Amplifikation von *PPT1* und benachbarten Genen in den Linien *cue1-1*, *cue1-6* und den jeweiligen Kontrolllinien

3.10.2 Durch DCG-Fütterung verursachte Veränderungen im Expressionsprofil der *cue1*-Mutante

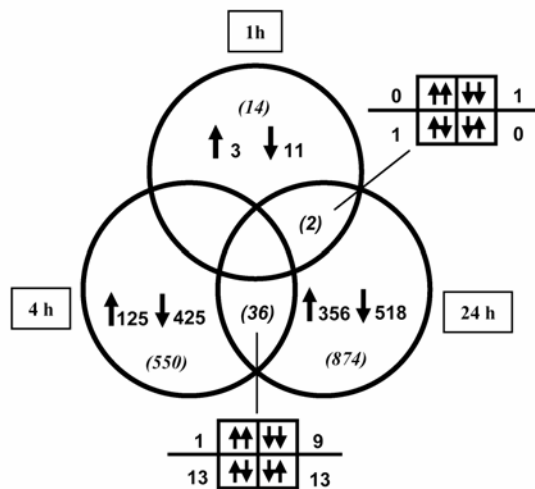
Durch Fütterung von *cue1-1* mit DCG wurde der retikulierte Phänotyp der Mutante revertiert (3.4). Daher sollte in einer Zeitreihe untersucht werden, welche Gene durch DCG in ihrer Expression verändert sind, bzw. welche nachgeschalteten Stoffwechselwege in der Mutante durch DCG-Aufnahme initiiert werden, die einen Einfluss auf die

Mesophyllentwicklung haben. Abbildung 3.10.2.1 zeigt Venn-Diagramme mit den Genen, deren Expression in *cue1-1* in einer Zeitreihe nach DCG-Fütterung von 1 h, 4 h und 24 h verändert war. Auffallend ist, dass keines der Gene eine Deregulierung zu allen drei Zeitpunkten nach DCG-Fütterung zeigte. Dafür war z. B. die Expression von zwei Genen nach 1 h auf MS+DCG hochreguliert und nach 4 h wieder im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt. Insgesamt waren die meisten Gene erst nach 4 h oder 24 h dereguliert. Auch hier wurde z. B. für 13 Gene eine induzierte Expression nach 4 h festgestellt, während die Expression nach 24-stündiger Anzucht auf DCG im Vergleich zur Kontrolle verringert war. Die Tabelle 3.10.2.1 zeigt alle deregulierten Gene in *cue1-1* in allen drei Zeitpunkten nach DCG-Fütterung, die entsprechend ihrer Funktion zusammengefasst wurden.

(A)



(B)



(C)

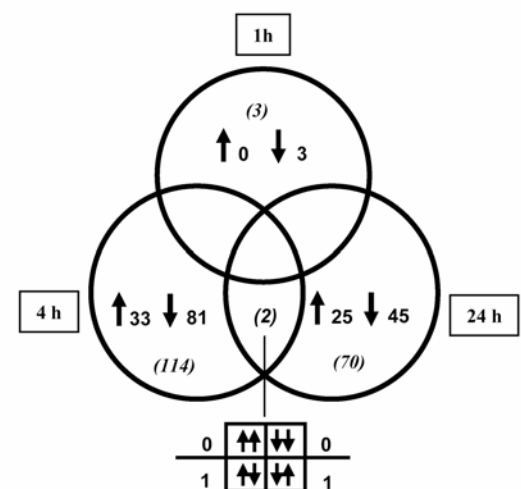


Abb. 3.10.2.1: Venn-Diagramme aller (A) und im Bereich von $\log_2 > 0,5 < -0,5$ (B) sowie $\log_2 > 1 < -1$ (C) deregulierten Gene in DCG-gefütterten *cue1-1*-Mutanten

Tab. 3.10.2.1: Anzahl der deregulierten Gene in *cue1-1* nach 1 h, 4 h und 24 h Fütterung mit DCG, sortiert nach Funktionsgruppen (**Teil 1**)

	Gesamt	1h DCG		4h DCG		24h DCG	
		↑	↓	↑	↓	↑	↓
Energy and basic metabolism, transport	306	3	0	15	97	124	76
transport	73			3	42	23	9
PS light reaction	28			1	6	22	
mitochondrial electron transport	16			2	7	1	6
TCA cycle	3				2	2	
Calvin cycle/OPP/photorespiration	28			1	2	23	2
minor CHO metabolism	13				6	5	3
major CHO metabolism	16				3	9	5
glycolysis/gluconeogenesis	4					3	1
C1-metabolism related	3			1		2	
Biodegradation of Xenobiotics							
lipid metabolism	26			4	5	10	7
N-metabolism	3				2	1	
amino acid metabolism	23			1	12	4	7
nucleotide metabolism	14				2	3	9
S-assimilation	1	1					
secondary metabolism	45	2		2	8	6	27
Co-factor and vitamins							
tetrapyrrole synthesis	10					10	
Stress response, environment	80	3	2	7	23	19	29
redox regulation	18			1	4	8	5
stress, biotic	21		1	3	3		14
stress, abiotic	40	3	1	3	16	11	9
stress	1						1
Development and Signalling	94	4	1	6	35	22	29
Development	34	2		3	12	3	16
signalling	50		1	1	22	17	9
metal handling	10	2		2	1	2	4

Tab. 3.10.2.1: Anzahl der deregulierten Gene in *cue1-1* nach 1 h, 4 h und 24 h Fütterung mit DCG, sortiert nach Funktionsgruppen (**Teil 2**)

	Gesamt	1h DCG		4h DCG		24h DCG	
		↑	↓	↑	↓	↑	↓
Hormone metabolismism	48	2	3	1	24	15	5
salicylic acid							
jasmonate	8		1		6	1	
gibberelin	3				1	2	
ethylen	11	1		1	4	3	3
cytokinin							
brassinosteroid							
auxin	22	1	2		11	7	2
abscisic acid	4				2	2	
DNA processing/Regulation of transcription	178	3	6	11	56	35	71
DNA unspecified	7				1		6
DNA synthesis	14			2	3	2	7
DNA repair	2				1	1	
RNA processing	21	1		2	6		12
RNA.RNA. Binding	7					2	5
RNA transcription	12		2	1	2	1	6
Regulation of transcription	115	2	4	6	43	29	35
Protein turnover, modification	273	1	4	32	52	44	149
protein synthesis	152			21	7	11	118
protein targeting	19			3	5	2	10
protein degradation	67		2	7	24	20	16
protein posttranslational modification	24	1	2		14	7	
protein assembly aa activation	7			1	1	2	3
protein folding	4				1	2	2
Cell structure, organisation, cell cycle	57	0	2	3	26	17	9
Cell organisation	16			1	7	6	2
Cell division	4				2	1	1
Cell cycle	5			2	1		2
Cell vesicle transport	2				2		
Cell wall	30		2		14	10	4
Miscellaneous/no ontology	290	6	3	29	85	61	110
miscellaneous function	82	5	1	9	26	15	27
P450	15	1			8	5	2
Pentatricopeptid repeat proteins	14				2	5	7
no ontology	179		2	20	49	36	74
Expressed proteins/unknown	235	1	6	36	53	58	88
Gesamt	1561	23	27	140	451	395	566

Die genomweite Expressionsanalyse sollte nähere Informationen zu Kandidatengenen liefern, die in die Entwicklungsprozesse eingebunden sind, die zur Ausprägung des *cue1*-Phänotyps führen. Tabelle 3.10.2.2 zeigt eine Gegenüberstellung der Gene, die sowohl in *cue1* als auch nach DCG-Behandlung gemeinsam dereguliert sind. Darunter befinden sich 49 Gene, deren Expression im Blatt der *cue1-1*-Mutante herabgesetzt war. Davon waren 4 Gene nach 1 h, 8 Gene nach 4 h und 37 Gene nach 24 h DCG-Fütterung hochreguliert. Von 24 in *cue1-1* Wurzeln herunterregulierten Genen war eines nach 1 h, 2 Gene nach 4 h und wieder der größte Anteil, nämlich 21 Gene nach 24 h DCG-Fütterung hochreguliert. Von den gegenübergestellten Genen konnte nur für 3 Gene eine verringerte Expression sowohl im Blatt als auch in der Wurzel der *cue1-1*-Mutante beobachtet werden, während jeweils eines dieser Gene nach 1 h, 4 h und 24 h DCG-Fütterung hochreguliert war.

Bei Betrachtung der annotierten Funktionen (Tabelle 3.10.2.2) fällt auf, dass viele Gene in die Lichtreaktion der Photosynthese eingebunden sind. Dies ist nicht unerwartet, da *cue1-1* Limitationen in diesem Bereich aufweist und eine Erhöhung der in der Mutante beeinträchtigten Genexpression mit dem kurierten Phänotyp korreliert. Weitere Gene sind in den Stoffwechsel von Phytohormonen wie Auxin eingebunden oder fungieren als Transkriptionsfaktoren.

Tab. 3.10.2.2: Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung (Teil 1)

Gen	Funktion	<i>cue1-1</i> Rosette	<i>cue1-1</i> Wurzel	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h
At4g21960	misc.peroxidases	-0,88	-0,69	0,37		
At5g59080	not assigned.unknown	-1,33	-0,67		1,33	
At3g01680	not assigned.unknown	-0,56	-1,10			0,58
At5g48540	not assigned.unknown	-1,14		0,38		
At1g17170	misc.glutathione S transferases	-0,55		0,39		
At3g44300	misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes	-1,04		0,92		
At1g02205	secondary metabolism.wax	-0,78		0,30		
At2g17500	hormone metabolism.auxin.synthesis-degradation	-1,00		0,41	-0,77	
At5g25840	not assigned.unknown	-0,58			0,71	
At1g63800	protein.degradation.ubiquitin.E2	-0,86			0,79	
At5g58570	not assigned.unknown	-0,95			0,83	
At4g23680	stress.abiotic.unspecified	-0,59			0,92	
At1g69410	protein.synthesis.initiation	-0,60			0,98	
At1g01680	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-0,74	0,84		1,12	
At3g02040	lipid metabolism.lipid degradation.lysophospholipases	-1,67	1,14		0,76	
At5g27280	RNA.regulation of transcription.unclassified	-1,42			0,59	
At5g20250	minor CHO metabolism.rafinoase family.rafinoase synthases.putative	-2,39				0,52
At1g80440	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-1,98				0,92
At1g22370	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	-1,74				0,52
At1g13650	not assigned.unknown	-1,61				1,34
At5g12940	not assigned.no ontology	-1,48				0,61
At4g10120	major CHO metabolism.synthesis.sucrose.SPS	-1,47				0,55
At4g01330	PS.lightreaction.state transition	-1,41				0,61
At2g32870	not assigned.no ontology	-1,33				0,82
At3g05640	protein.posttranslational modification	-1,20				0,68
At3g26280	misc.cytochrome P450	-1,05				0,61
At2g01890	misc.acid and other phosphatases	-1,04				0,83
At1g14240	nucleotide metabolism.degradation	-1,03				0,88
At3g53800	not assigned.no ontology.arnadillo/beta-catenin repeat family protein	-1,03				0,72
At2g39980	secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins	-0,79				0,73
At3g62750	not assigned.no ontology	-0,76				0,57
At2g39850	protein.degradation.subtilases	-0,74				0,71
At5g35790	OPP.oxidative PP.G6PD	-0,72				0,59
At3g48350	Expressed protein	-0,71				0,50
At1g43670	major CHO metabolism.synthesis.sucrose.FBPase	-0,65				0,78
At4g30690	protein.synthesis.initiation	-0,63				0,56
At1g73750	not assigned.unknown	-0,63				0,66
At2g37130	misc.peroxidases	-0,62				0,54

Tab. 3.10.2.2: Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung (Teil 2)

Gen	Funktion	<i>cue1-1</i> Rosette	<i>cue1-1</i> Wurzel	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h
At1g75960	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	-0,59				0,62
At2g29170	secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	-0,57				0,86
At5g08410	redox.thioredoxin	-0,54				0,66
At5g44680	DNA.repair	-0,54				0,58
At4g35470	not assigned.no ontology	-0,52				0,57
At5g35170	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.adenylate kinase	-0,51				0,77
At3g47620	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-0,72				0,72
At3g27690	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	-1,78				1,09
At4g01330	PS.lightreaction.state transition	-1,41				0,61
At1g19150	PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	-0,79				0,77
At1g14150	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	-0,60				0,67
At2g18300	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	-0,72				0,51
At1g76110	RNA.regulation of transcription.Nucleosome/chromatin assembly factor group	-0,66				1,09
At1g21250	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1,43				0,64
At1g56120	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat V/III-2	-1,26				0,74
At1g21120	misc.O- methyl transferases		-0,66	0,45		
At1g68540	secondary metabolism.phenylpropanoids		-0,62		0,61	
At5g59320	lipid metabolism.lipid transfer proteins etc		-0,58		1,05	
At1g09340	not assigned.unknown		-1,44			0,78
At1g76080	redox.thioredoxin		-1,03			0,69
At4g02530	not assigned.no ontology		-0,95			0,61
At1g22430	misc.alcohol dehydrogenases		-0,82			0,83
At5g19140	metal handling		-0,68			0,64
At2g22980	protein.degradation.serine protease		-0,68			0,89
At5g02160	not assigned.unknown		-0,64			0,82
At5g23240	stress.abiotic.heat		-0,55			0,61
At4g19160	not assigned.unknown		-0,53			0,76
At5g26820	transport.metal		-0,50			0,96
At2g33830	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated		-0,73			0,60
At2g25450	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation		-0,81			0,69
At4g21280	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits		-1,49			0,53
At1g20020	PS.lightreaction.other electron carrier (ox/red).ferredoxin reductase		-0,97			0,74
At3g50820	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits		-0,90			0,93
At1g03600	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits		-0,78			0,83
At2g20260	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits		-0,53			0,73
At2g47850	RNA.regulation of transcription.unclassified		-0,95			0,50
At5g47110	RNA.regulation of transcription.unclassified		-0,86			0,74
At1g09750	RNA.regulation of transcription.unclassified		-1,59			0,79
At2g43010	signalling.light		-1,07			0,66

3.10.3 Deregulierung der Genexpression durch einen transienten RNAi-Ansatz

Die Expressionsdaten zeigten, dass nach einer Induktion von 168 h in Gegenwart von Ethanol eine hohe Anzahl von Genen (ca. 3800) in den Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien dereguliert war. Unter Berücksichtigung der auf Ethanol angezogenen Wildtyp-Kontrollen, konnte festgestellt werden, dass ca. 22% dieser Gene bereits auf Ethanol ansprachen. Dieser deutliche Ethanol-Effekt auf die Genexpression zeigte sich auch noch zum Zeitpunkt 72 h bzw. 120 h nach dem Transfer der Pflanzen auf Ethanol-freies Medium.

Bei der Auswertung der Expressionsanalyse wurden zunächst die Gene berücksichtigt, die sowohl in *cue1* als auch in den induzierten Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien (168 h Ethanol) aufgrund des *PPT1* knock-downs gleichermaßen dereguliert waren. Für viele der hier gemeinsam herunterregulierten Gene zeigte sich bei Rückkehr des *PPT1* Signals und der Reversion des retikulierten Phänotyps nach 72 h bzw. 120 h Ethanol-Entzug wiederum eine erhöhte Expression. Durch Induktion der Expression des RNAi-Konstrukts konnte die *PPT1*-Transkriptmenge stark herabgesetzt werden, das *cue1-1* Niveau aber nicht ganz erreichen (Tab. 3.10.3.1). Dies korrelierte mit der Ausbildung des retikulierten Phänotyps in den transformierten Linien, der zu diesem Zeitpunkt nicht in allen Rosettenblättern zu beobachten war (Abb. 3.9.2.2). Durch den Ethanol-Entzug war *PPT1* nach 72 h um den Faktor 1,45 und nach 120 h um den Faktor 2,58 gegenüber dem Zeitpunkt der Induktion (168 h EtOH) hochreguliert.

AGIcode	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	Col-0/ <i>alcA:PPT1</i> RNAi 168 h EtOH	Col-0/ <i>alcA:PPT1</i> RNAi EtOH → MS 72 h	Col-0/ <i>alcA:PPT1</i> RNAi EtOH → MS 120 h
At5g33320	-3,10	-3,41	-2,75	-2,22	-1,38
		Faktor*	1,00	1,45	2,58

Tab. 3.10.3.1: Microarray-Daten der *PPT1*-Expression (log2-Werte sind angegeben) *Der Faktor gibt das Verhältnis der Induktion des *PPT1* nach Ethanol-Entzug relativ zum Zeitpunkt 0 (168 h EtOH) an.

Auf die Expression der *PPT1*-benachbarten Gene, die in *cue1-1* gemeinsam mit *PPT1* stark dereguliert waren, zeigte die Induktion keinen Effekt. Somit konnte die Vermutung, dass die *cue1-1* Mutagenese durch γ -Strahlen neben *PPT1* selbst auch zu Deletionen in weiteren Genen führte, zusätzlich zur durchgeführten DNA-Analyse (Abb. 3.10.1.2), bestätigt werden.

Tabelle 3.10.3.2 zeigt eine Auflistung ausgewählter Gene, verglichen mit den Microarray-Daten für *cue1* und der DCG-Fütterung. Dabei wurde auch berücksichtigt, welche Wirkung Ethanol auf das Transkriptom ausübte. Auf die *PPT1*-Expression hatte Ethanol keinen Effekt. Jedoch zeigten alle in Tabelle 3.10.3.2 aufgeführten Kandidaten einen starken Rückgang in der Expression als Antwort auf Ethanol.

Eines von zwei Genen, die im Auxin-Stoffwechsel eingebunden sind, war nach Ethanol-Induktion sehr stark reprimiert ($\log_2 < -5$), zeigte dann zum Zeitpunkt 72 h nach Ethanol-Entzug eine signifikante Erhöhung in der Expression ($\log_2 > 2$), die, leicht auf $\log_2 = 0,76$ verringert, auch nach 120 h zu beobachten war. Hinsichtlich der Ethanol-Wirkung auf die Expression dieses Gens (At3g44300), das für die Nitrilase 2 (NIT2) kodiert, konnte auch eine starke Repression ($\log_2 < -4$) festgestellt werden. Somit lässt sich die starke Verringerung der Expression bei RNAi-Induktion z. T. durch den Ethanol-Effekt erklären. *NIT2* ist aber auch in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA dereguliert und eine verstärkte Expression konnte nach einstündiger DCG-Fütterung beobachtet werden, die hier mit der Reversion des retikulierten Phänotyps einherging.

Einige Gene unbekannter Funktion, wie z. B. At1g19180 und At2g41640, waren sowohl in *cue1-1* als auch in den induzierten Linien stark dereguliert und wurden nach Ethanol-Entzug und Rückkehr des *PPT1* Signals verstärkt exprimiert. Die Fütterung mit DCG hatte hier keinen Einfluss auf die Genexpression.

Durch die Gegenüberstellung der Daten aus den unterschiedlichen Microarrays, konnten somit einige Gene in die engere Auswahl gestellt werden, die als Kandidaten für weitere Untersuchungen zur Überprüfung ihrer putativen Signalfunktion bei der Ausbildung des retikulierten Phänotyps dienen können.

Tab. 3.10.3.2: Auswahl deregulierter Gene in Col-0/*alcA:PPT1*RNAi nach Ethanol-Induktion und nach Entzug der Ethanol-Quelle, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Expressionsanalyse in *cue1* und nach DCG-Fütterung

$\log > 3$	$\log > 1$	$\log > 0,5$	$\log < -0,5$	$\log < -1$	$\log < -3$
------------	------------	--------------	---------------	-------------	-------------

3.11 Identifizierung von „Zielgenen“ durch einen *Activation tagging* Ansatz im *cue1*-Hintergrund

3.11.1 Die Suche nach *cue1*-Revertanten

Die Transformation der *cue1-1*-Mutanten erfolgte mit hohem Durchsatz (ca. 10.000 Individuen) unter Verwendung des *Activation tagging* Vektors pSKI015 (Weigel et al., 2000; Abb. 3.11.1.1). Die T-DNA des Vektors enthält eine sich 4 x wiederholende *Enhancer* Sequenz (= 4 x CaMV35S-Promotor), die verstärkend auf den Promotor der T-DNA-Insertionsstelle angrenzenden Gene wirken kann. Transformanden, die keinen retikulierten Phänotyp mehr zeigten, wurden für weitere Studien selektiert. In diesen T-DNA Insertionslinien wurden die T-DNA flankierenden DNA-Sequenzen ermittelt und über RT-PCR Gene identifiziert, die gegenüber der Kontrolle eine erhöhte Expression aufwiesen.

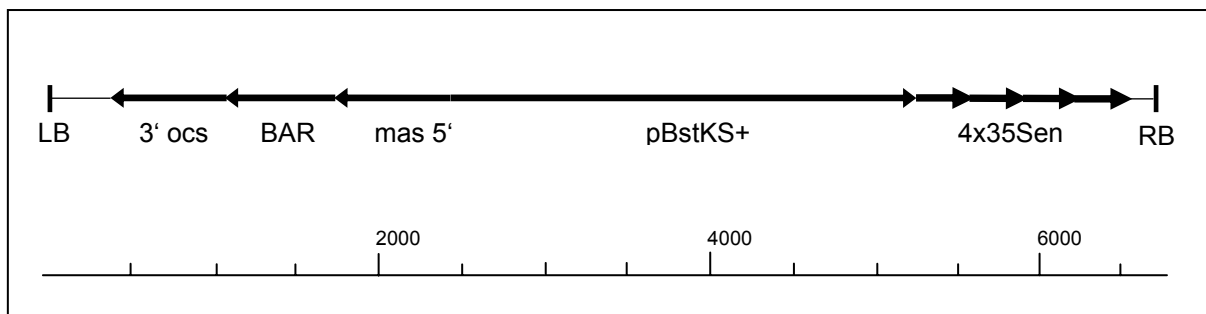


Abb. 3.11.1.1: T-DNA-Sequenz des *Activation tagging* Vektors pSKI015

(LB = left border; 3' ocs = 3' end (octopine synthase); BAR = Basta®-Resistenz; mas 5' = 5' end (mannopine synthase); pBstKS+ = pBluescript KS+; 4 x 35Sen = 4 x CaMV35S-Enhancer; RB = right border)

(A)

(B)



Abb. 3.11.1.2: Transformation einer hohen Anzahl an *cue1-1*-Mutanten (A) und Ernte der Samen (B) zur Anzucht und Selektion potentieller Revertanten

Die Nachkommen der transformierten *cue1-1* Individuen wurden durch Besprühen mit BASTA® selektiert. Mit einer Transformationsrate von 0,25% (Transformationsrate von pOCA zum Vergleich: 0,5%) wurden ca. 30.000 T-DNA-Mutanten ermittelt, die für die Suche nach potentiellen Revertanten zur Verfügung standen (Abb. 3.11.1.2).

3.11.2 Kann der retikulierte Phänotyp durch Verstärkung der Expression eines Gens im *cue1*-Hintergrund kuriert werden?

Unter den Transformanten, die im *cue1*-Hintergrund das *Activation tagging*-Konstrukt exprimierten, befanden sich einige Pflanzen mit veränderter Blattmorphologie- und anordnung, jedoch konnte nur eine Mutante identifiziert werden, bei der eine Reversion des retikulierten Phänotyps deutlich zu erkennen war (Abb. 3.11.2.1). Somit wurde diese Linie für weitere Studien herangezogen und die anderen mutagenisierten Populationen nicht näher untersucht.

Mittels PCR-Walking (s. 2.2.8.9.2) unter Verwendung T-DNA-spezifischer und genomischer Oligonukleotide wurde die Insertionsstelle im Genom der Mutante ermittelt. Die Insertion befand sich in einem Gen, das für eine Pectinesterase kodiert (Abb. 3.11.2.2). Durch Analyse der Expression der im Bereich der Insertionsstelle lokalisierten Gene (s. Anhang 8.4) konnte mittels RT-PCR ein Gen identifiziert werden, dessen Expression in der *Activation tagging* Mutante gegenüber Kontrollen hochreguliert war (Abb. 3.11.2.3). Bei diesem Gen handelte es sich um eine Nicotianaminsynthase (At5g04950), die die Bildung von Nicotianamin, ein Polyamin, aus S-Adenosyl-Methionin katalysiert und in die Eisenaufnahme von Pflanzen eingebunden ist (Scholz et al., 1992; Stephan und Scholz, 1993; Ling et al., 1999; Herbik et al., 1999; Takahashi et al., 2003; Perovic et al., 2006; Bauer et al., 2007).

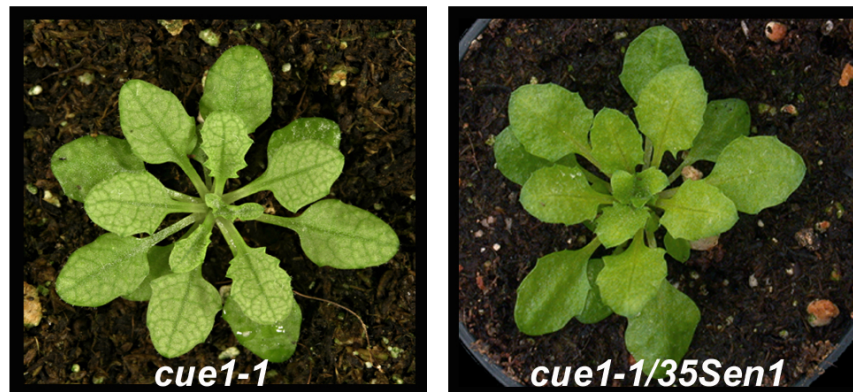


Abb. 3.11.2.1: Reversion des retikulierten Phänotyps in der *Activation tagging* Mutante (*cue1-1/35Sen1*) im Vergleich zu *cue1-1*

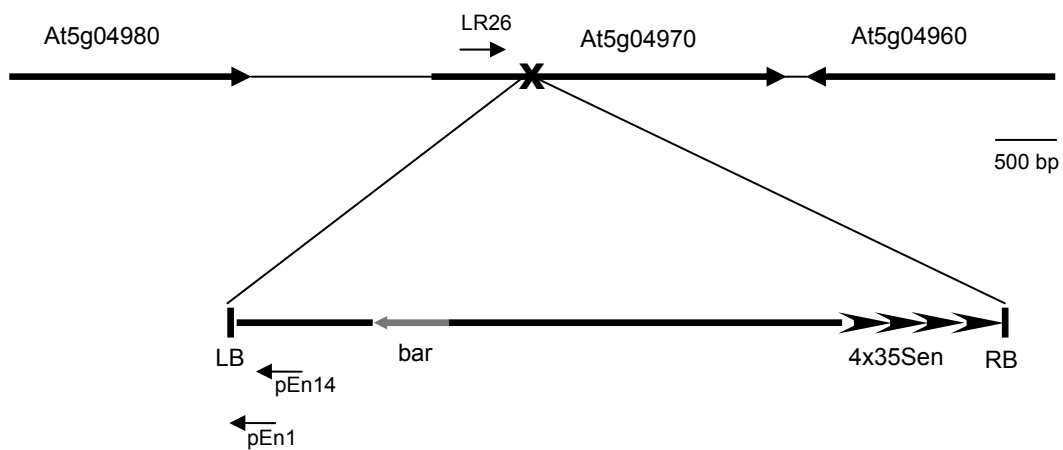


Abb. 3.11.2.2: Schematische Darstellung der T-DNA-Insertionsstelle in *cue1-1/35Sen1* mit Angabe der verwendeten Primer. Die T-DNA inseriert im 1. Exon der Pectinesterase (*At5g04970*).

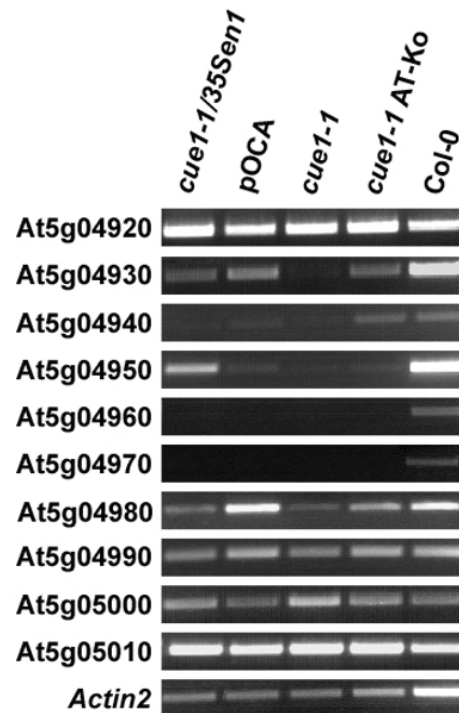


Abb. 3.11.2.3: Agarosegel mit RT-PCR Produkten nach 33 Reaktionszyklen
Bezeichnungen der Linien: *cue1-1/35Sen1*(*enhancer*)1; pOCA, *cue1-1* und Col-0 (Kontrollen) sowie *cue1-1 AT* (*Activation tagging*)-Ko (Kontrolle) als transformierte *cue1-1*

Die Expression der Gene At5g04920, At5g04940 und At5g04990-05010 war in der *cue1-1/35Sen1* Mutante im Vergleich zu den Kontrollen unverändert. At5g04980 kodiert für ein Protein der Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase Familie und scheint in pOCA im Vergleich zu allen *cue1-1* Linien stärker exprimiert zu sein. Das für die Pectinesterase kodierende Gen (At5g04970) mit der T-DNA-Insertion im ersten Exon sowie At5g04960, ebenfalls ein Gen der Pectinesterase-Familie, waren nur schwach exprimiert (siehe Col-0; Vergleich Actin-Kontrolle). Beim Nachweis der Produkte für die Nicotianaminsynthese (At5g04950), war eine verstärkte Expression des Gens in *cue1-1/35Sen1* im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen. Abbildung 3.11.2.3 zeigt, dass dieses Gen in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA etwas schwächer exprimiert war, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass der retikulierte *cue1*-Phänotyp durch Überexpression der Nicotianaminsynthese kuriert werden konnte. Die Insertionslinie *cue1-1/35Sen1* war im Wachstum ähnlich der *cue1*-Mutante verzögert. Es war nicht möglich, von *cue1-1/35Sen1* Samen zu gewinnen, um Nachkommen dieser Linie für weitere Studien

zu erhalten. Die Infloreszenzen bildeten sich in der Revertante erst nach ca. 8 Wochen. Bevor die Entwicklung der Schoten einsetzte, zeigten die Rosettenblätter eine hellbraune Färbung, die sich auf die gesamte Pflanze ausweitete und zum Verlust der Mutante führte (Abb. 3.11.2.4).



Abb. 3.11.2.4: Stadium der *cue1-1/35Sen1* Revertante nach ca. 3 Monaten

3.12. Die Isolierung von *ppdk*- und *p-enolase*-Mutanten sowie Herstellung und Analyse von *ppdk x cue1-1* und *p-enolase x cue1-1* Doppelmutanten

Um zu klären, ob eine mögliche endogene Aktivität der plastidären Pyruvat, P_a -Dikinase eine Rolle bei der Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg in bestimmten Geweben oder Stadien der Pflanzenentwicklung dient, wurden T-DNA Insertionslinien isoliert, die einen Defekt in der PPDK zeigten. Die Kreuzung der homozygoten *ppdk*-Mutanten mit *cue1-1* und die anschließende Analyse der Doppelmutanten sollten zeigen, ob der zusätzliche Funktionsverlust der PPDK Auswirkungen auf den Phänotyp und die Entwicklung der Mutanten hervorruft.

Um die Bedeutung einer möglicherweise vollständigen plastidären Glykolyse für die Anlieferung von PEP im Stroma zu klären, sollte außerdem der Effekt des

Funktionsverlustes der potentiell plastidären Enolase (At1g74030) untersucht werden. Es gibt noch zwei weitere, cytosolische Gene (At2g29560, At2g36530), die für Enolasen kodieren. Da mindestens drei der Phosphoglyceratmutasen für plastidäre Enzyme kodieren, wurde die als plastidär annotierte Enolase für diesen Ansatz ausgewählt. Nach Analyse der entsprechenden Doppelmutanten wäre die Herstellung von Dreifach-Mutanten der nächste Schritt, um zu überprüfen, ob das Ausschalten aller bekannten Möglichkeiten, PEP im Plastiden bereitzustellen, zu letalen Mutanten führt.

3.12.1 Analyse der Expression von *PPDK* und *p-Enolase* in *cue1* im Vergleich zum Wildtyp

Bei den Microarray-Analysen konnten in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA keine Veränderungen in der Expression der *PPDK* und der *p-Enolase* festgestellt werden. Auch über RT-PCR wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression der *p-Enolase* in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA detektiert (Abb. 3.12.1.1). Die potentiell plastidäre *Enolase* war in beiden Linien verstärkt in der Wurzel exprimiert. Auch das in „Genevestigator“ erhältliche Expressionsspektrum aus verschiedenen Geweben von *A. thaliana* weist auf eine verstärkte Expression der *p-Enolase* in diesem Gewebe hin (Abb. 3.12.1.2).

Die *PPDK* scheint in Blattrosetten von *cue1-1* gegenüber pOCA geringer exprimiert zu sein, allerdings war der Unterschied im Vergleich zu der *Actin2*-Kontrolle nicht signifikant. Die *PPDK*-Expression war in der Wurzel schwächer als in Blättern. Dies konnte mit Hilfe der in „Genevestigator“ erhältlichen Daten bestätigt werden (Abb. 3.12.1.2). In pOCA Wurzeln war kein Signal für *PPDK* zu erkennen (Abb. 3.12.1.1 A und B). Eine stärkere Expression wurde hingegen in den Wurzeln der Mutante beobachtet.

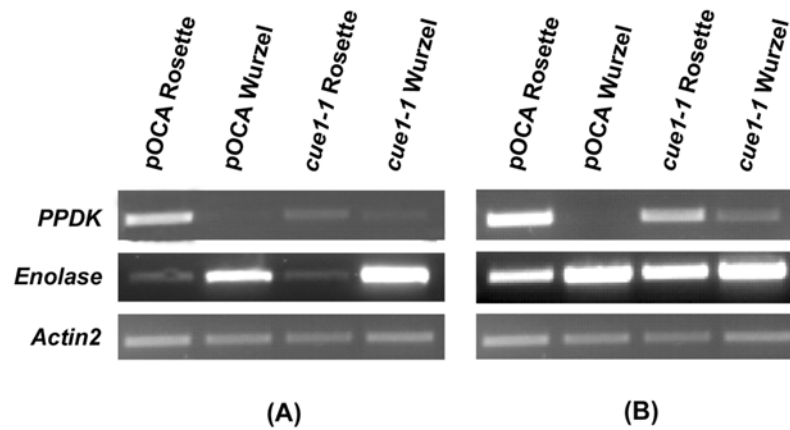


Abb. 3.12.1.1: RT-PCR Analyse der Expression von *PPDK* und *p-Enolase* in ca. 28 Tage alten Rosetten und Wurzeln von *cue1-1* im Vergleich zu *pOCA*; (A) 28 Zyklen (B) 30 Zyklen; je 23 Zyklen für *Actin2*

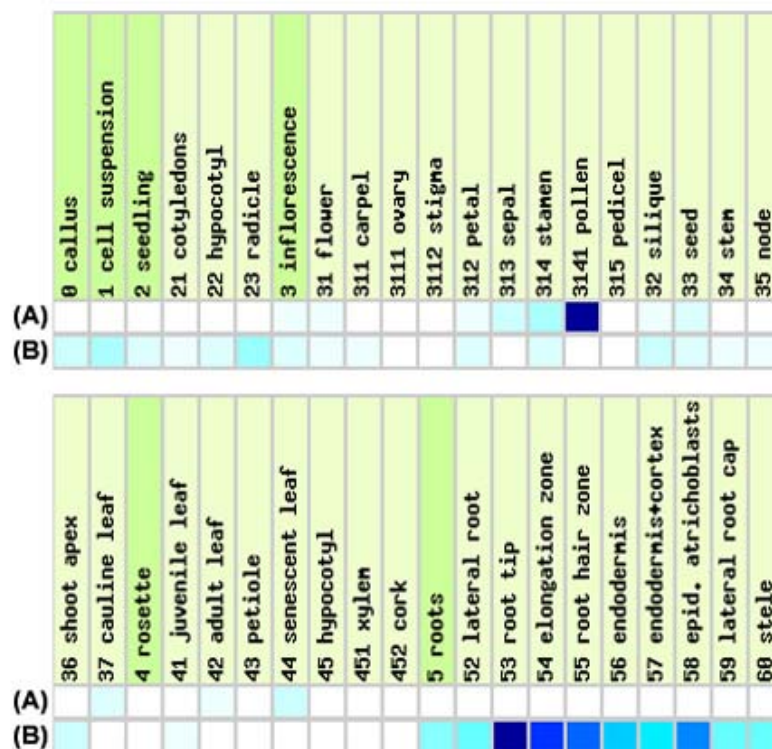
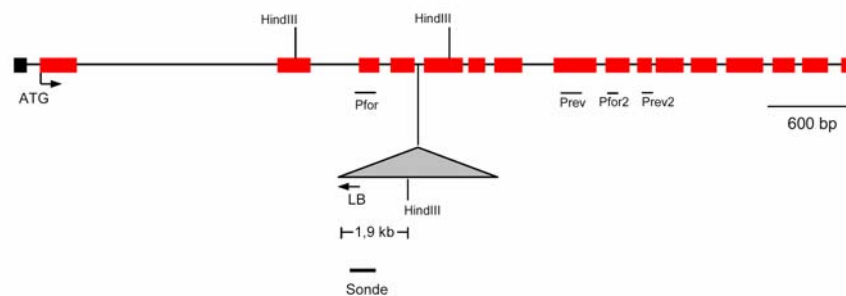


Abb. 3.12.1.2: Expression der *PPDK* (A) und der *p-Enolase* (B) während der Pflanzenentwicklung; Die verwendeten Daten stammen von AtGenExpress und NASC (www.genevestigator.ethz.ch). Die *heat maps* (Falschfarbendarstellung) wurden in blau-weißer Farbabstufung für die absoluten Werte der Signalintensität erstellt.

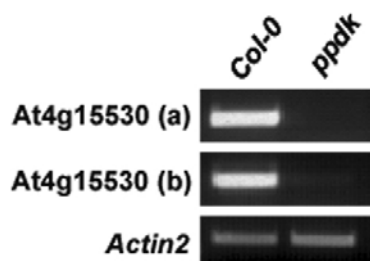
3.12.2 Die *ppdk* und *ppdk x cue1-1* Mutanten

Aus der SALK-T-DNA-Mutanten-Kollektion wurde eine Pflanzenlinie mit einer T-DNA-Insertion im vierten Intron am *PPDK*-Lokus (At4g15530) isoliert (Abb. 3.12.2.1 A). In der homozygoten *ppdk*-Mutante konnten keine *AtPPDK*-Transkripte über RT-PCR (Abb. 3.12.2.1 B) mit genspezifischen Primern nachgewiesen werden. Durch *Southern*-Blot Analyse wurden für die *ppdk*-Mutante mehrere T-DNA-Insertionen ermittelt (Abb. 3.12.2.1 C). Die auf Erde und auf MS-Medium angezogenen *knock-out*-Linien zeigten keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (Abb. 3.12.2.2).

(A)



(B)



(C)

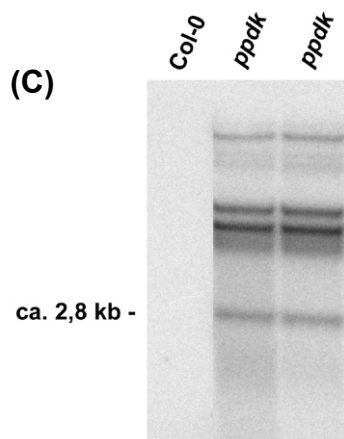


Abb. 3.12.2.1: Molekulare Charakterisierung der *ppdk*-Mutante.

(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von *ppdk* mit Angabe der T-DNA-Insertionsstelle sowie die Lage der *HindIII*-Schnittstellen und Primer (B) RT-PCR mit den Primerkombinationen Pfor/Prev (a) und Pfor2/Prev2 (b); 31 Zyklen für *At4g15530* und 25 Zyklen für *Actin2* (C) *Southern*-Blot; *HindIII* verdaute DNA von *ppdk* (Doppelprobe) und Col-0 wurden mit einer T-DNA spezifischen Sonde (siehe A) hybridisiert. Die Größe des zu erwartenden *HindIII*-Fragments für *ppdk* ist angegeben.



Abb. 3.12.2.2: Der Phänotyp auf MS-Medium angezogener *ppdk*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (ca. 3-4 Wochen alt). Komplet (A) und Detail Blattrosette Col-0 (B) und *ppdk* (C)

Die *ppdk*-Mutante wurde mit *cuel-1* gekreuzt und die zweite Generation nach homozygoten Doppelmутanten durchmustert. Unter den getesteten Mutanten befanden sich vier Pflanzen, für die mit insertionsspezifischen Primern in der PCR-Analyse ein positives Signal detektiert wurde (Abb. 3.12.2.3). Abbildung 3.12.2.4 zeigt, dass die Doppelmутanten keinen von *cuel* abweichenden Blattphänotyp ausprägten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Doppelmутanten gegenüber *cuel-1* teilweise längere Wurzeln besaßen. Aufgrund dieses Befunds wurden die *PPDK* überexprimierenden Linien im *cuel-6* und Col-0 Hintergrund (*cuel-6/PPDK* und Col-0/*PPDK*) zum Vergleich herangezogen (Abb. 3.12.2.5). Während kein signifikanter Unterschied zwischen der Wurzellänge der *cuel-6/PPDK* und der *cuel-6* Mutante festzustellen war, zeigten die Col-0/*PPDK* Linien im Vergleich zu Col-0 kürzere Wurzeln.

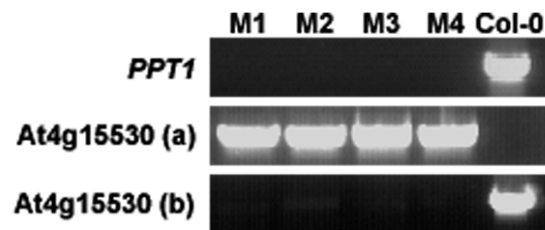


Abb. 3.12.2.3: PCR-Analyse der homozygoten *ppdk x cue1-1* Doppelmutanten (M1-M4). Die Primerkombination aus T-DNA-spezifischen *left border primer* (LB) und genspezifischen Pfor (in Abb. 3.12.2.1 A gezeigt) diente zur Identifizierung von Pflanzen mit mutiertem Allel (a). Die genspezifische Primerkombination Pfor und Prev diente zur Identifikation von Pflanzen mit Wildtyp-Allel der PPDK (b).



Abb. 3.12.2.4: Der Phänotyp der homozygoten *ppdk x cue1-1* Doppelmutante. Detail: *cue1-1* (B) und *ppdk x cue1-1* (C); ca. 4 Wochen alt

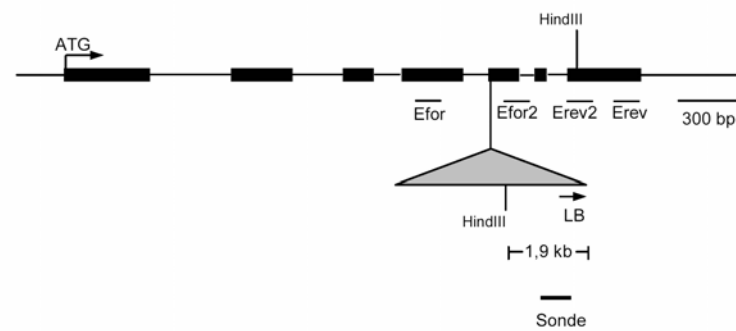


Abb. 3.12.2.5: Der Wurzelphänotyp der *PPDK*-überexprimierenden Linien *cue1-6/PPDK* und *Col-0/PPDK* gegenüber Kontrolllinien.

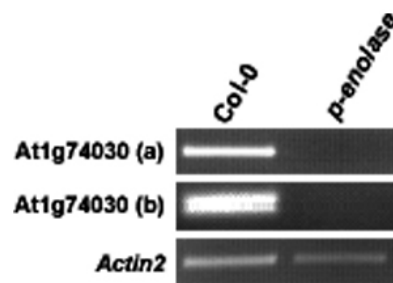
3.12.3 Die *p-enolase* und *p-enolase x cue1-1* Mutanten

Bei der aus der SALK-T-DNA-Mutanten-Kollektion isolierten potentiell plastidären *Enolase*-Mutante (At1g74030), liegt die T-DNA im fünften Exon des Gens (Abb. 3.12.3.1 A). Die als homozygot identifizierte Mutante wurde mittels RT-PCR überprüft (Abb. 3.12.3.1 B). Mit den Primerkombinationen Efor und Erev sowie Efor2 und Erev2 konnten für die *knock-out*-Mutante keine Produkte amplifiziert werden. Durch *Southern*-Blot Analysen wurde festgestellt, dass die *p-enolase*-Mutante mehrere T-DNA-Insertionen trägt (Abb. 3.12.3.1 C). Im Hinblick auf den Phänotyp der Mutante war kein Unterschied zum Wildtyp (Col-0) erkennbar (Abb. 3.12.3.2).

(A)



(B)



(C)

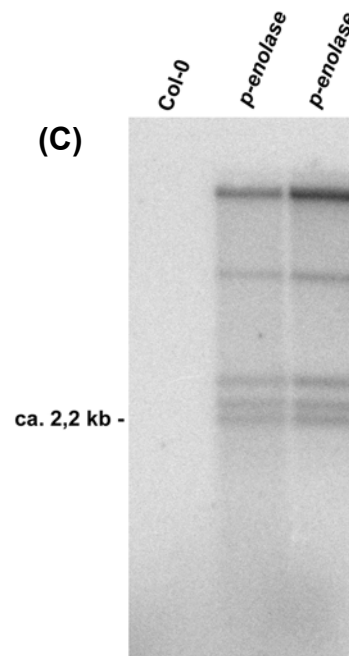


Abb. 3.12.3.1: Molekulare Charakterisierung der insertionsmutagenisierten *p-enolase*-Mutante.

(A) Schematische Darstellung des *Enolase*-Gens mit Angabe der T-DNA-Insertion, Schnittstellen und verwendeten Primer (B) RT-PCR Analyse mit zwei verschiedenen Primerkombinationen (a) Efor/Erev und (b) Efor2/Erev2 (C) Nachweis der T-DNA-Insertionen über *Southern*-Blot mit Angabe der Größe des zu erwartenden *Hind*III-Fragments für *p-enolase*.



Abb. 3.12.3.2: Der Phänotyp der *p-enolase*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Anzucht erfolgte für ca. 3-4 Wochen auf MS-Medium. Komplet (A) und Detail Blattrosette *p-enolase* (B) und Col-0 (C)

Nach Kreuzung der *p-enolase*-Mutante (weibl.) mit *cue1-1* (männl.) konnten bei Durchmusterung von ca. 300 Pflanzen der F₂-Generation nur vier heterozygote und keine homozygoten Doppelmutanten isoliert werden. In diesen, in der Enolase heterozygoten Linien wurde durch PCR mit T-DNA-spezifischen und genspezifischen Primer (LB/Erev) ein Produkt amplifiziert und unter Verwendung einer genspezifischen Primerkombination (Efor/Erev) auch ein Signal für das Wildtyp-Allel detektiert (Abb. 3.12.3.3 A). Für *PPT1* konnte nur im Wildtyp ein Amplifikat erhalten werden. Die heterozygoten Doppelmutanten prägten einen retikulierten Blattphänotyp aus, zeigten aber im Vergleich zu den *cue1-1*-Mutanten ein stark retardiertes Wachstum (Abb. 3.12.3.4).

Unter den Nachkommen der heterozygoten *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten befanden sich wiederum keine homozygoten Linien. Es konnten nur vier heterozygote Doppelmutanten isoliert werden, die anderen 70 getesteten Pflanzen wiesen kein T-DNA-mutiertes Allel auf (Abb. 3.12.3.3 B).

Durch weitere Untersuchungen der heterozygoten Linien wurde festgestellt, dass die Schoten der Doppelmutanten im Vergleich zu *cue1-1* gestaucht und die Anzahl der Samen um ca. 50% reduziert waren.

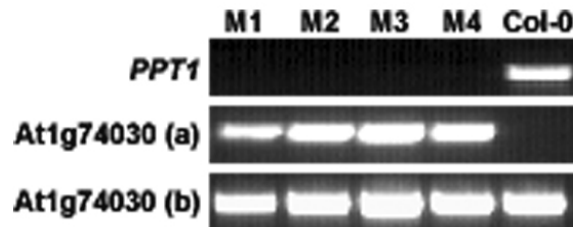


Abb. 3.12.3.3: PCR-Analyse zur Überprüfung des Allelzustandes der *p-enolase x cue1-1* Doppelmutanten (M1-M4). Die Primerkombination aus T-DNA-spezifischen *left border primer* (LB) und genspezifischen Erev (in Abb. 3.12.3.1 A gezeigt) diente zur Identifizierung von Pflanzen mit mutiertem Allel (a). Die genspezifische Primerkombination Efor und Erev diente zur Identifikation von Pflanzen mit Wildtyp-Allel der *p-Enolase* (b).

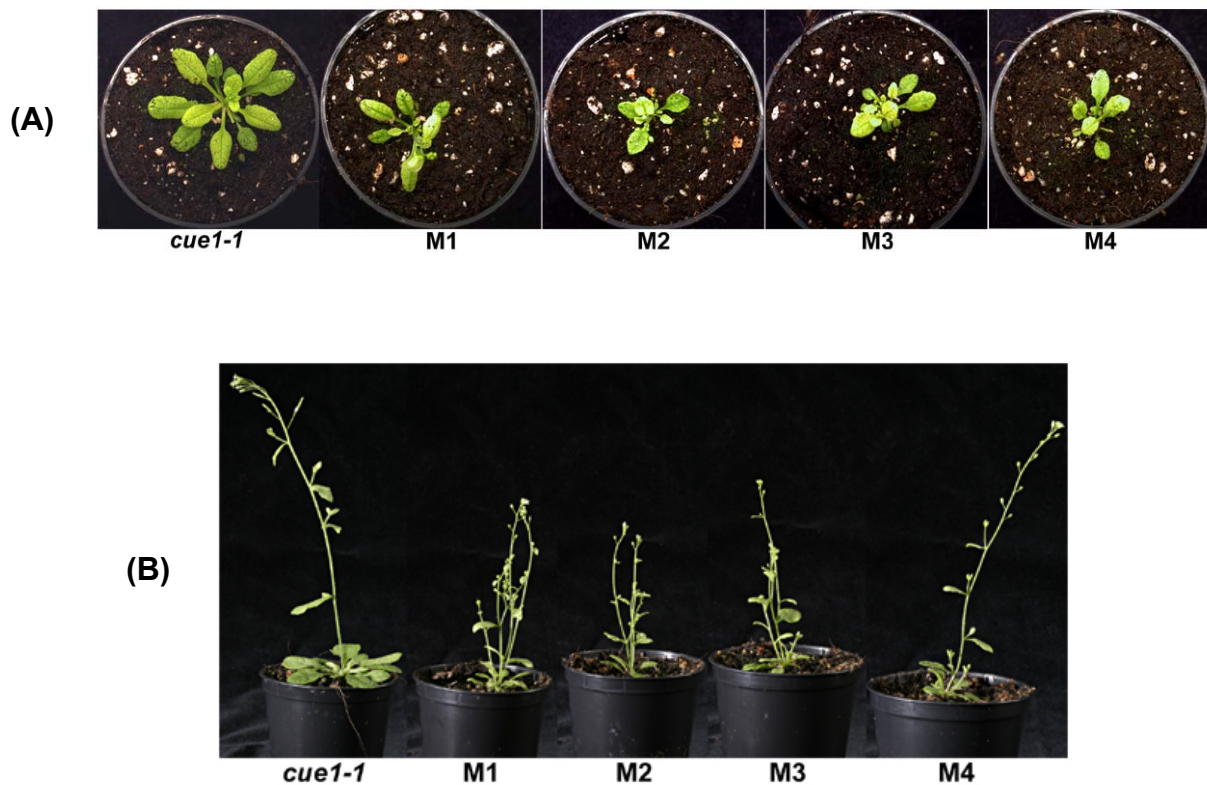


Abb. 3.12.3.4: Der Phänotyp der heterozygoten *p-enolase x cue1-1* Doppelmutanten nach 6-7 Wochen (A) und nach 9 Wochen (B) Anzucht im Gewächshaus.

3.12.5 Bestimmung der Enolase-Aktivität

Der Einfluss des *knock-outs* der *Enolase* in der *p-enolase*-Mutante wurde auf der Ebene von Enzymaktivitäten untersucht (s. 2.2.10.2.2). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das in der Mutante beeinträchtigte Gen für eine putativ plastidäre Enolase kodiert und noch zwei weitere Enolasen in *A. thaliana* existieren, die im Cytosol lokalisiert sind. Die Enzymaktivitäten wurden in Blättern und Wurzeln der *p-enolase*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Tab. 3.12.4.1). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der Enolase in der Mutante sowohl in Blättern als auch in Wurzeln verringert war. Die plastidäre *Enolase* ist gegenüber den cytosolischen *Enolase*-Genen hauptsächlich in der Wurzel exprimiert. Hier war die Enolase-Aktivität in der *p-enolase*-Mutante um ca. 45%, in den Blattrosetten um 20% relativ zum Wildtyp herabgesetzt. Mit Ausnahme der *cue1-6* Wurzel konnte in den *cue1*-Mutanten eine erhöhte Aktivität der Enolase gegenüber dem zugehörigen Wildtyp festgestellt werden.

	Rosette mU/mg Protein	Wurzel mU/mg Protein
Col-0	44,4 ± 6,7	247 ± 12,5
<i>p-enolase</i>	35,7 ± 4,6	133 ± 21,8
<i>cue1-6</i>	91,2 ± 7,1	116 ± 21,9
<i>cue1-1</i>	106,7 ± 8,6	125 ± 21,1
pOCA	61,7 ± 2,4	100 ± 5,5

Tab. 3.12.4.1: Enolase-Aktivitäten in mU/mg Protein in Blattrosetten und Wurzeln verschiedener *A. thaliana* Linien. n=4 (Rosette) n=3 (Wurzel)

3.13 Untersuchungen zum Nachweis von Flavonoiden in der *cue1*-Mutante

Durch Promoter-GFP Analyse konnte eine hohe *PPT1*-Expression in den Wurzelspitzen von *A. thaliana* festgestellt werden, während der *PPT2* in den Wurzeln nicht exprimiert ist (Knappe et al., 2003). Folglich sollte der Funktionsverlust des PPT1 und die daraus resultierenden Einschränkungen in der Synthese von aromatischen AS wie Phenylalanin zu

einer starken Limitation an Produkten des Phenylpropanstoffwechsels in den Wurzeln der *cue1*-Mutante führen. Die folgenden Ansätze zur Untersuchung der Flavonoidgehalte in den Wurzeln der *cue1*-Mutanten, *ppdk* und *ppdk x cue1-1* Doppelmutanten (3.13.1) sowie *p-enolase*-Mutanten (3.13.2) im Vergleich zum Wildtyp sollten Hinweise auf die Bedeutung des PPT1 für die Synthese von Flavonoiden in den Wurzelspitzen liefern.

3.13.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flavonoiden in der Wurzel

Durch die Behandlung von 8-10 Tage alten Keimlingen mit DPBA (s. 2.2.10.3) konnte eine gelbe bis grünliche Sekundärfluoreszenz von Flavonoiden induziert werden. In Abbildung 3.13.1.1 (A-I) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit DPBA-behandelten Wurzeln von *cue1*, *ppdk*, *ppdk x cue1-1* Doppelmutanten sowie Wildtyp gegenübergestellt. Zwischen den einzelnen Linien wurden keine signifikanten Veränderungen der Flavonoid-spezifischen Fluoreszenzintensitäten festgestellt. In der Wurzel war in allen Keimlingen eine stark gelbe Fluoreszenz im Bereich der Wachstumszone zu beobachten, die auf eine Akkumulation von Quercetin oder Naringenin-Chalkon hindeutet (in Abb. 3.13.1.1 markiert). Die blau-grünliche Fluoreszenz im Bereich der Wurzelspitze ist möglicherweise auf Kaempferol-Derivate zurückzuführen. Genaue Aussagen über die einzelnen Substanzklassen konnten nicht getroffen werden. Entgegen den Erwartungen zeigten die Ergebnisse, dass die *cue1*-Mutanten ebenso wie der Wildtyp in der Lage sind, Flavonoide zu akkumulieren. Auch in den *ppdk* und *ppdk x cue1-1* Doppelmutanten wurden keine signifikanten Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der Flavonoide beobachtet.

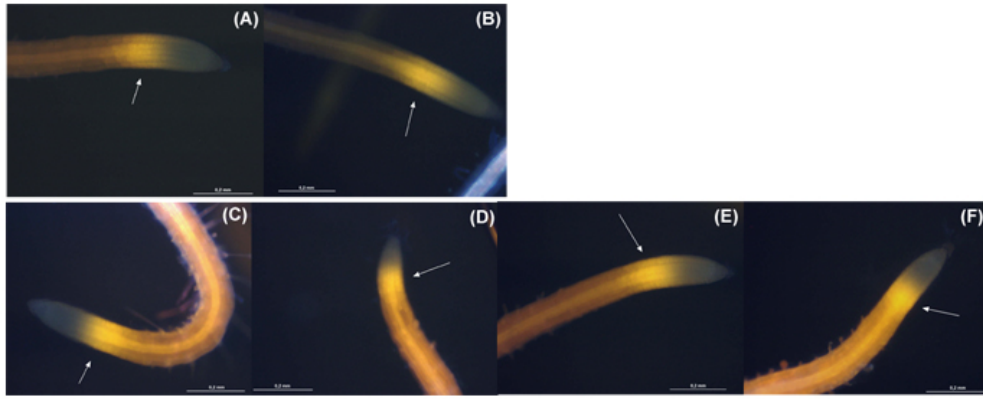


Abb. 3.13.1.1: Akkumulation von Flavonoiden in DPBA-behandelten Wurzeln von 8-10 Tage alten Keimlingen: (A) Col-0, (B) *cue1-6*, (C) pOCA, (D) *cue1-1*, (E) *ppdk*, (F) *ppdk x cue1-1* (Ex.: 330 nm < λ < 380 nm, Em.: λ > 420 nm)

3.13.2 HPTLC-Analyse der Gehalte an Flavonoiden in Wurzeln und Blattrosetten

Neben der Untersuchung der Flavonoidakkumulation in intakten Keimlingswurzeln, stellt die Auftrennung der phenolischen Substanzen über eine hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC) eine weitere Möglichkeit dar, Unterschiede im Flavonoidgehalt der einzelnen Pflanzenlinien aufzuzeigen. Hierbei wurden methanolische Extrakte aus Blättern und Wurzeln der Mutanten und Wildtypen hergestellt und auf Kieselgelplatten aufgetragen. Nach Behandlung mit DPBA wurden die aufgetrennten Inhaltsstoffe im UV-Licht aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzfarben identifiziert. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte im Labor von Prof. Dr. B. Weisshaar in Zusammenarbeit mit Dr. R. Stracke (Universität Bielefeld).

Abbildung 3.13.2.1 zeigt die Chromatogramme mit den aufgetrennten Substanzen aus den methanolischen Extrakten aus Blattrosetten und Wurzeln von *cue1-1*, *cue1-6* und den *ppdk*- und *p-enolase*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Es konnten hauptsächlich blau fluoreszierende Sinapoyl-Derivate, aber kaum Flavonol-Derivate detektiert werden. Unterschiede im Auftrennungsmuster der Substanzen weisen daraufhin, dass in der Blattrosette gegenüber der Wurzel z. T. andere Sinapoyl-Derivate zu finden sind. Die durch DPBA-induzierte Sekundärfluoreszenz war vor allem in zwei Sinapoyl-Derivaten (I und II) in den Wurzeln sehr stark ausgeprägt. In der Wurzel waren gegenüber den Blattrosetten allgemein stärkere Signale zu beobachten. In pOCA und den *cue1-1*-Wurzeln

konnten zwei Substanzen mit einer rötlich-gelben Sekundärfluoreszenz detektiert werden, die in den anderen Linien fehlten oder nur als sehr schwaches Signal, wie hier in den Wurzeln der *ppdk*-Mutante, erkennbar waren. Bei diesen Substanzen handelte es sich aufgrund der Fluoreszenzfarbe möglicherweise um Anthocyane. Signifikante Unterschiede im Auftrennungsmuster der Substanzen in *cue1* oder den anderen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp waren nicht zu erkennen. Dieser Befund unterstützt die in 3.13.1 dargelegten Hinweise, dass die *cue1*-Mutanten in der Lage sind, in der Wurzel ohne Anwesenheit eines PPT vom Phenylpropanstoffwechsel abgeleitete Substanzen zu akkumulieren. Da es aber in diesem Ansatz nicht möglich war, Flavonoide zu detektieren, sondern nur einige Sinapoyl-Derivate aufzutrennen, konnten keine Aussagen hinsichtlich eines in *cue1* veränderten Spektrums an Flavonoiden gegenüber dem Wildtyp getroffen werden. Der Einsatz von Pflanzen jüngerer Stadiums (hier bereits ca. 3 Wochen alt) und veränderte Anzuchtbedingungen (z. B. Starklicht) hätten möglicherweise zum Nachweis einer größeren Menge unterschiedlicher Flavonol-Derivate und somit zu einem besseren Ergebnis geführt. Weitere Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr durchgeführt.

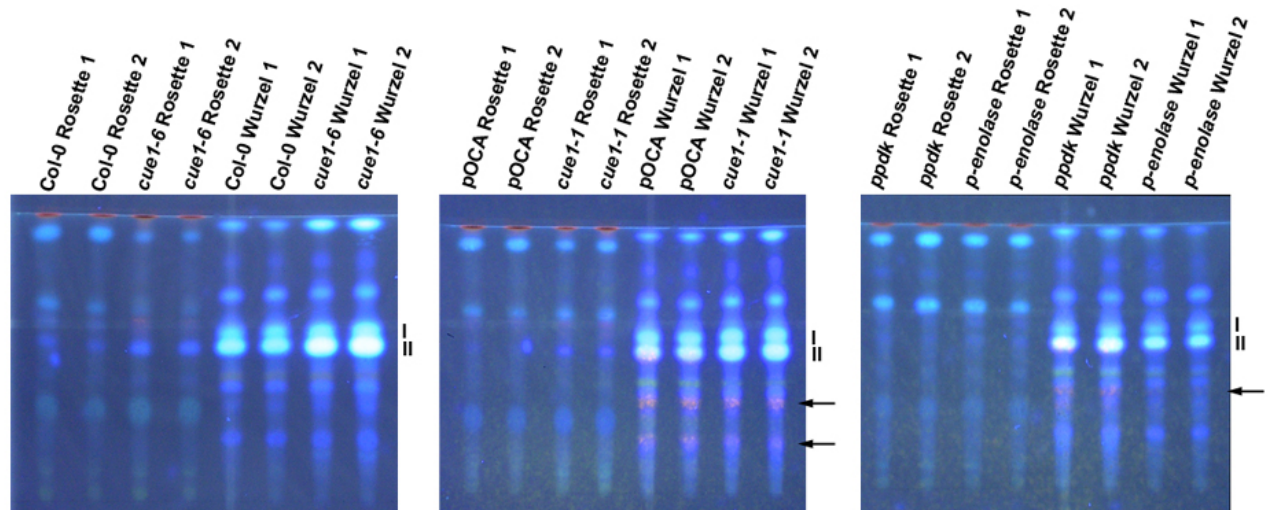


Abb. 3.13.2.1: Dünnschichtchromatographische Auftrennung phenolischer Substanzen in Blattrosetten und Wurzeln von *cue1-1*, *cue1-6*, *ppdk* und *p-enolase* im Vergleich zum Wildtyp. Die Sekundärfluoreszenz wurde durch Behandlung mit DPBA induziert. Einige Substanzen sind mit Nummern (I + II) und Pfeilen (rötlich-gelbe Fluoreszenz) markiert.

3.15. Weitere Ergebnisse

3.14.1 Die Analyse der NO-Gehalte in *cue1* im Vergleich zum Wildtyp

Genetische Untersuchungen an der NO-überproduzierenden Mutante *nox1* aus *A. thaliana* führten zu dem Befund, dass die *nox1*-Mutante identisch zur *cue1*-Mutante ist (He et al., 2004). Mittels PCR-Analyse wurde festgestellt, dass der PPT1 in der *nox1*-Mutante deletiert war. Ein retikulierter Blattphänotyp ähnlich der *cue1*-Mutante ist auch in *nox1* ausgeprägt. He et al. (2004) stellten darüber hinaus fest, dass die Gehalte an NO sowie an freien L-Arginin und L-Citrullin in *cue1* stark erhöht waren. NO kann durch die NO-Synthase (NOS) katalysierte Synthese der Aminosäure Citrullin aus Arginin generiert oder über die Nitratreduktase (NR) aus Nitrit gebildet werden (Wendehenne et al., 2001; del Rio et al., 2004).

Es wurde eine gemeinsame Hypersensitivität von *nox1* und *cue1* auf den NO-Donor SNP (Natriumnitroprussid) festgestellt (He et al., 2004). Die Auswirkung von SNP auf das Wurzelwachstum der *cue1*-Mutanten wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse unterstützen die in He et al. (2004) beschriebenen Beobachtungen. Abbildung 3.14.1.1 zeigt, dass die *cue1*-Mutante in Gegenwart von SNP kürzere Wurzeln ausbildete. Ein derart verzögertes Wurzelwachstum wurde im Wildtyp nicht beobachtet.

Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der NO-Gehalte in Wurzeln von *cue1* im Vergleich zum Wildtyp konnte der in He et al. (2004) postulierte Befund, dass NO in der *cue1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp überproduziert wird, nicht bestätigt werden. Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte anlehnend an den in Guo et al. (2003) gezeigten Nachweis der NO-Gehalte in Wurzeln der *Atnos1*-Mutante. Diese Mutante weist aufgrund des Defektes in der NOS geringere NO-Gehalte gegenüber dem Wildtyp auf. Anhand der in Abbildung 3.14.1.2 gezeigten DAF-2DA vermittelten grünen Fluoreszenzsignale für NO konnte kein direkter Hinweis auf höhere Gehalte in der *cue1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp geliefert werden. Ein signifikanter Unterschied in den Signalintensitäten war sowohl zwischen *cue1-1* und pOCA als auch zwischen *cue1-6* und Col-0 nicht zu erkennen. Weitere Versuchsserien, die genauere Aussagen liefern könnten, wurden aber im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht mehr durchgeführt.

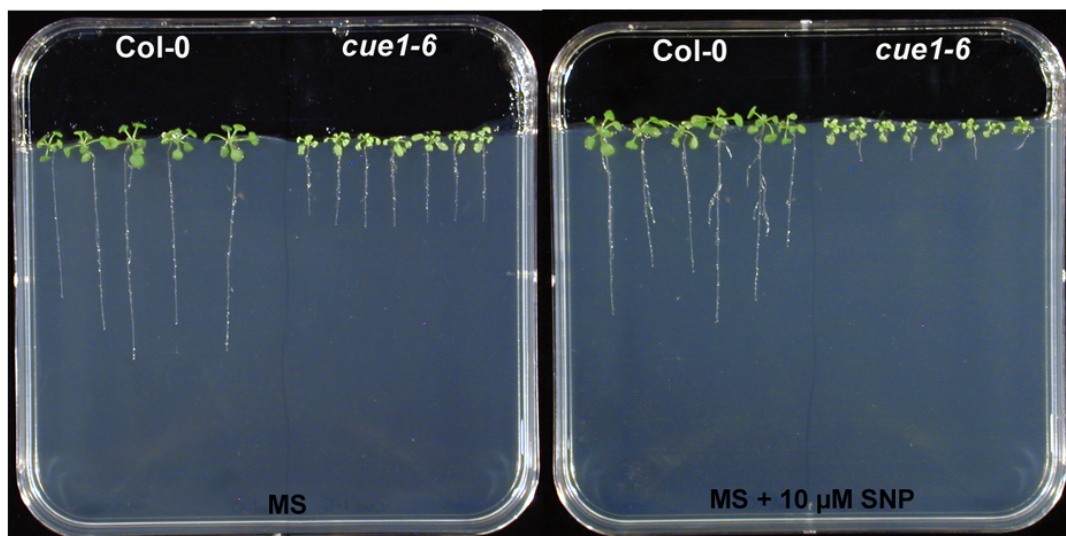


Abb. 3.14.1.1: Einfluss von SNP auf das Wurzelwachstum der *cue1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für 2-3 Wochen auf MS, supplementiert mit 10 μM SNP (Kontrolle: MS ohne Zusatz von SNP).

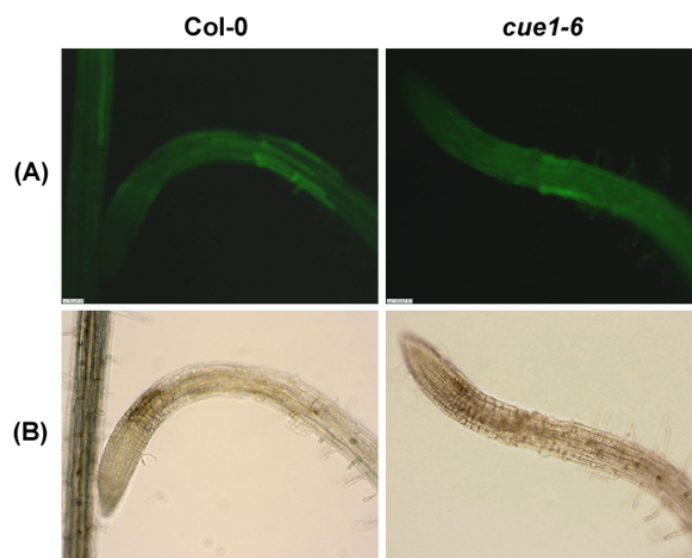


Abb. 3.14.1.2: NO-Produktion in 6 Tage alten *cue1*-Mutanten und Wildtypkontrollen. Die grüne Fluoreszenz wird durch den NO-sensitiven Farbstoff DAF-2 DA hervorgerufen, mit dem die Keimlinge zuvor behandelt wurden (Guo et al., 2003). (A) DAF-2 DA-Fluoreszenz (B) Durchlichtaufnahme

3.14.2 Die *lcd1*-Mutante

Die Identifizierung von Mutanten, die einen *cue1*-ähnlichen retikulierten Blattphänotyp ausprägen, liefern weitere Ansätze zur Untersuchung möglicher Ursachen für die Entwicklung des Phänotyps. Die bereits Anfang der 60er Jahre beschriebene *A. thaliana*-Mutante *reticulata* (Rédei und Hirono, 1964) weist eine Störung in der Blattstruktur auf, die in eine geringere Zelldichte im Mesophyll der Interkostalfelder resultiert. Im Gegensatz zur *cue1*-Mutante äußert sich die Mutation in den untersuchten *Reticulata*-Allelen nicht in pleiotropen Effekten und weist vor allem im Hinblick auf die äußere Blattstruktur kaum Unterschiede zum Wildtyp auf (González-Bayón et al., 2006). Das in *reticulata* defekte Gen kodiert für ein Protein unbekannter Funktion und ist identisch mit *LCD1*, welches durch eine erhöhte Ozon-Sensitivität der *lcd1-1*-Mutante identifiziert werden konnte (Barth und Conklin, 2003). Für *LCD1* und *PPT1* wurde hinsichtlich der Genexpression eine relativ hohe Korrelation festgestellt (Abb. 3.14.2.1). Beide Gene sind stark in den Wurzelspitzen exprimiert (Abb. 3.14.2.2).

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde aus der SALK Institute Kollektion eine T-DNA-Insertionslinie am *AtLCD1* Locus isoliert (Abb. 3.14.2.3 A). Mittels RT-PCR konnten in der homozygoten Mutantenlinie keine Transkripte für *LCD1* nachgewiesen werden (Abb. 3.14.2.3 B). Für die *knock-out*-Mutante wurde über Southern Blot Analyse mit einer T-DNA-spezifischen Sonde nur eine Insertion ermittelt (Abb. 3.14.2.3 C). Abbildung 3.14.2.4 A zeigt, dass die *lcd1*-Mutante zwar einen *cue1*-ähnlichen retikulierten Blattphänotyp ausprägte, aber im Wachstum keine Retardierung aufwies. Auch hinsichtlich der Wurzelentwicklung zeigte *lcd1* gegenüber dem Wildtyp keine Veränderungen (Abb. 3.14.2.4 B).

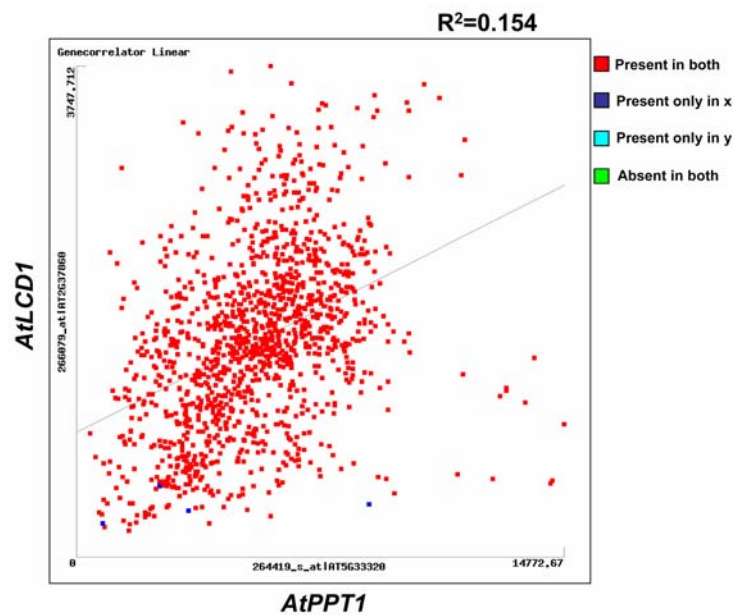


Abb. 3.14.2.1: Co-Expression der Gene *LCD1* und *PPT1*. Die ermittelten Daten stammen aus dem Programm „Gene Correlator“ unter Verwendung des Affymetrix GeneChips (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>)

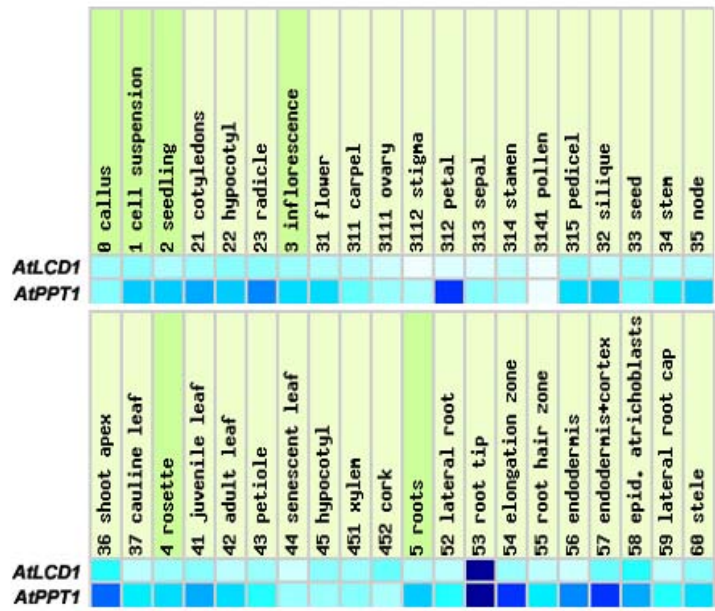


Abb. 3.14.2.2: Expression der Gene *LCD1* und *PPT1* in Pflanzengewebe. Die verwendeten Daten stammen aus dem Programm „Meta Analyzer“ (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>). Die absoluten Werte der Signalintensitäten sind in blau-weißer Farbabstufung dargestellt (*heat maps*).

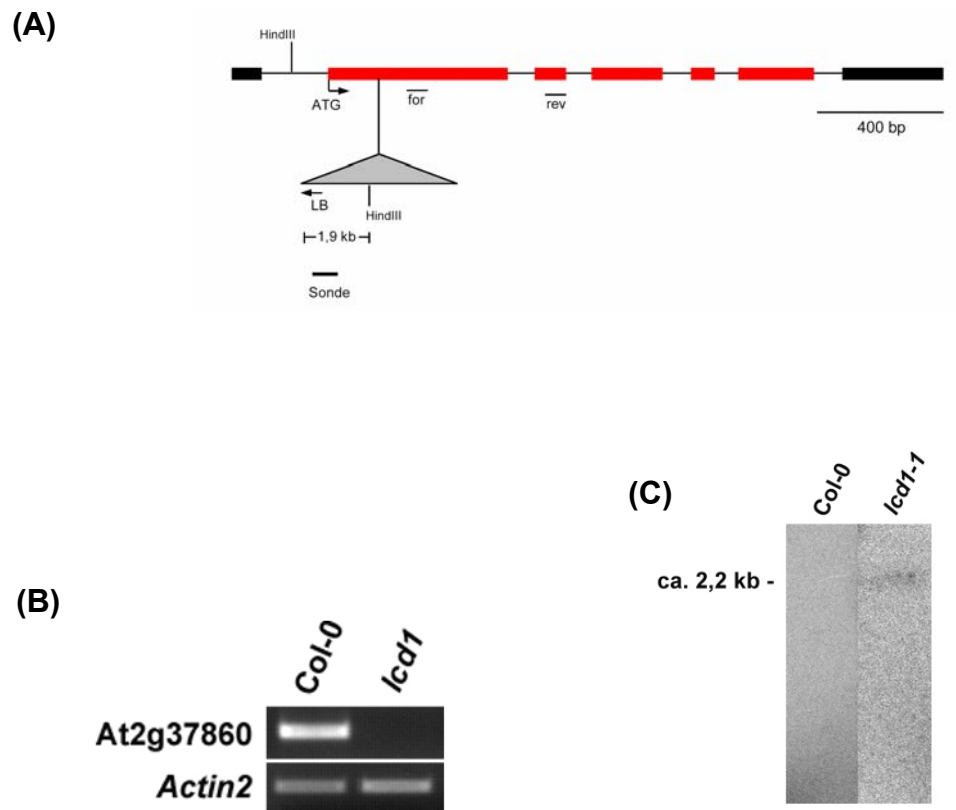
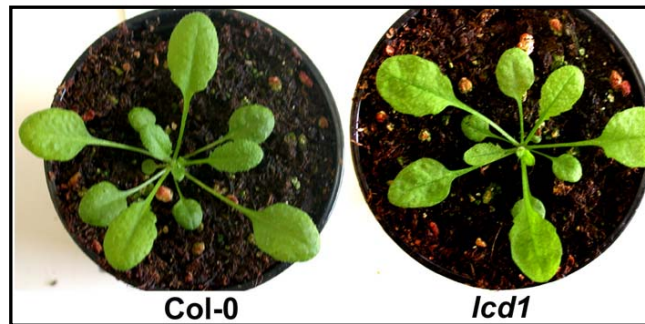


Abb. 3.14.2.3: (A) Schematische Darstellung der *AtLCD1*-Genstruktur mit Angabe der T-DNA-Insertion und Lage der verwendeten Primer sowie der Sonde für die Southern Blot Hybridisierung (B) RT-PCR-Amplifikation mit der Primerkombination for/rev (*At2g37860*) (C) Southern Blot mit Angabe der Größe des zu erwartenden *HindIII*-Fragments

(A)



(B)

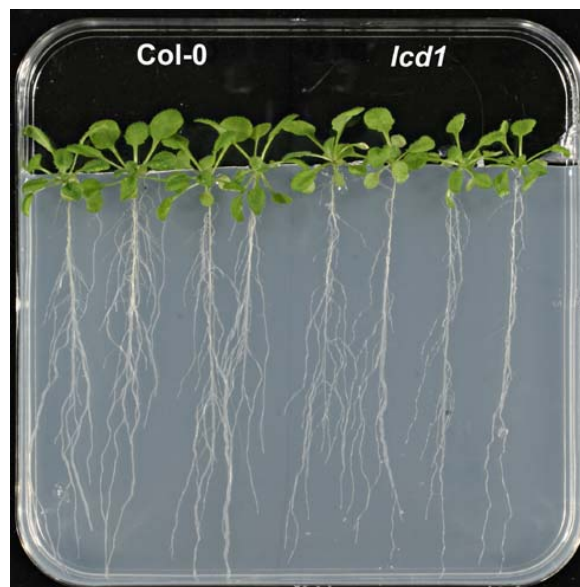


Abb. 3.14.2.4: Der Phänotyp der *lcd1*-Mutante im Vergleich zu Col-0. Die Anzucht erfolgte für 4-5 Wochen unter Gewächshausbedingungen (A) und 3-4 Wochen auf MS-Agarplatten (B)

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere experimentelle Ansätze zur Klärung des kausalen Zusammenhangs zwischen dem Funktionsverlust von AtPPT1 und den Störungen in der Entwicklung der *cue1*-Mutante verfolgt. Hierbei wurde vor allem die Verbindung zwischen den Limitationen im Phenylpropanstoffwechsel und der Ausbildung des retikulierten *cue1*-Blattphänotyps untersucht und die Rolle des AtPPT1 in der Bereitstellung von potentiellen Signalmetaboliten für die Mesophyllentwicklung diskutiert. Über verschiedene Strategien, inklusive einer genomweiten Expressionsanalyse, wurde nach „Kandidatengen“ gesucht, die eine Bedeutung innerhalb der in *cue1* gestörten Entwicklungsprozesse haben könnten. Dabei wurden mögliche Verbindungen zwischen Limitationen im Sekundärstoffwechsel und hormoneller Kontrolle der Pflanzenentwicklung untersucht.

Zudem wurde die Bedeutung der PPK und einer funktionellen plastidären Glykolyse bei der Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg durch die Charakterisierung von *ppdk*- und *p-enolase*-T-DNA-Insertionsmutanten und durch die Analyse von *ppdk* x *cue1-1* und *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten näher beleuchtet.

4.1 Die Bedeutung des AtPPT1 und nachgeschalteter Reaktionen für eine korrekte Mesophyllentwicklung

4.1.1 Durch Fütterung mit DCG und Cytokinin wird der retikulierte *cue1*-Blattphänotyp revertiert.

Die in Tamagnone et al. (1998a, b) untersuchten transgenen Tabakpflanzen, in denen durch Überexpression von *MYB*-Genen aus *Antirrhinum majus* die Funktionalität der endogenen *MYB*-Transkriptionsfaktoren eingeschränkt ist, prägen einen *cue1*-ähnlichen Phänotyp aus. Die Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation der endogenen *MYB*-Faktoren führte zu Limitationen im Phenylpropanstoffwechsel, die in reduzierten Gehalten an Lignin und weiterer Sekundärmetabolite resultierten. In weiteren Studien von Zellkulturen dieser transgenen Tabaklinien wurde ein Mangel an Dehydrodiconiferylalkohol-Glukosiden (DCGs) festgestellt, durch deren externe Zugabe der aberrante Phänotyp und

die Wachstumsabnormalitäten der transgenen Zellkulturen revertiert werden konnte (Tamagnone et al., 1998b).

Aufgrund dieser Hinweise wurde DCG als Neolignan und Derivat des Phenylpropanstoffwechsels in den in 3.4 beschriebenen Fütterungsexperimenten von intakten Pflanzen eingesetzt. Die Möglichkeit einer transienten Reversion des *cue1*-Phänotyps konnte zuvor durch Fütterung mit einer Mischung der drei aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp in *cue1* nachgewiesen werden (s. 3.3). Durch Anzucht der *cue1*-Mutanten für 7-9 Tage in Gegenwart von DCG konnte der retikulierte Blattphänotyp nur bei zuvor entwurzelten Pflanzen revertiert werden. Wie bereits in den Untersuchungen anhand transgener Tabakzellkulturen gezeigt wurde, scheint eine Aufnahme von DCG durch intakte Pflanzen nicht möglich zu sein (Tamagnone et al., 1998b). Eine Reversion des *cue1*-Phänotyps erfolgte nur, wenn die Sprossachse direkt auf den MS-Agar platziert wurde.

Aufgrund dieser Beobachtungen könnte eine mangelnde Bereitstellung von DCG in den *cue1*-Mutanten eine Ursache für die Ausprägung des aberranten Phänotyps sein. Studien zur Bestimmung der DCG-Gehalte in *A. thaliana* wurden aber bisher noch nicht durchgeführt. Diese würden genauere Aussagen hinsichtlich eines möglichen Mangels an dieser Substanz in der *cue1*-Mutante zulassen. DCG konnte bisher aus *Vinca rosea* Tumorzellen (Lynn et al., 1987), Tabak (Binns et al., 1987) und aus weiteren Pflanzenarten wie Limonen (Matsubara et al., 1991), Läusekraut (Changzeng and Zhongjian, 1997; Wang und Jia, 1997), Cistanche (Yoshizawa et al., 1990) und aus Flachs-Zellkulturen (Attoumbré et al., 2006) isoliert werden. Es wurde festgestellt, dass die wachstumsfördernden Aktivitäten der DCG-Enantiomere durch den Einfluss von Cytokinen verstärkt werden (Binns et al., 1987). In Studien von Teutonico et al. (1991) wurde nachgewiesen, dass die DCG-Akkumulation durch Behandlung mit Cytokinin stimuliert und die Förderung der Zellteilungsaktivität über DCG vermittelt werden kann. Weitere Untersuchungen weisen daraufhin, dass Cytokine einen Einfluss auf die Stabilität der DCGs haben und die Aktivität der Glykosyltransferase, welche die Glykosylierung von DCA zu DCG katalysiert, kontrollieren kann (Teutonico et al., 1991; Orr und Lynn, 1992). Die externe Zugabe des Aglykons DCA führte in den transgenen *AmMyb308* überexprimierenden Tabakzellkulturen zu einer raschen Glykosylierung und Generierung von DCG (Tamagnone et al., 1998b). In Agrobakterium-induzierten Tumorzellen aus Tabak wurden neben DCG auch hohe Aktivitäten an Peroxidasen gemessen, die bei der Dimerisierung von CA zu DCA eine Rolle zu spielen scheinen

(Black et al., 1994). Die Fütterung der *cue1*-Mutanten mit den DCG-Vorstufen DCA oder CA hatte aber keine Reversion des retikulierten Phänotyps zur Folge. Möglicherweise fehlen diesen Pflanzen die nötigen Enzyme für die Synthese der aktiven DCG-Isomere, oder die Synthese von DCG ist zellspezifisch. Auch muss berücksichtigt werden, dass CA die Vorstufe für die Synthese von Gerüstsubstanzen wie Lignin darstellt und die beteiligten Enzyme möglicherweise um das Substrat konkurrieren. Für DCGs und Cytokinine konnten gemeinsame wachstumsfördernde Wirkungen nachgewiesen werden, und es wurde vermutet, dass beide Substanzen Komponenten der gleichen Signaltransduktionskaskade darstellen (Teutonico et al., 1991). Daher wurden die *cue1*-Mutanten auch in Gegenwart von trans-Zeatin und Kinetin angezogen. Der retikulierte Phänotyp der intakten Pflanzen wurde innerhalb von 8-10 Tagen revertiert. Diese Beobachtung lässt die Existenz einer Signaltransduktionskette vermuten, die sowohl von DCG als auch von Cytokinin angesteuert werden kann und möglicherweise in die Kontrolle der Mesophyllentwicklung eingebunden ist.

4.1.2 Die Auswahl an „Zielgenen“ durch eine genomweite Expressionsanalyse

4.1.2.1 Das genomweite Expressionsprofil in Blättern und Wurzeln der *cue1-1*-Mutante

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte genomweite Expressionsanalyse in Blättern und Wurzeln der *cue1-1* Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle, konnte zunächst einen Einblick gewähren, welche Auswirkungen der Funktionsverlust des AtPPT1 auf die Genexpression der Pflanze hat. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von insgesamt fast 3000 Genen in *cue1-1* gegenüber pOCA verändert war, davon 2174 Gene in der *cue1*-Blattrosette und 628 Gene in der *cue1*-Wurzel. Nur 182 Gene waren sowohl in Blättern als auch in Wurzeln dereguliert. Darunter befanden sich neben dem *AtPPT1* weitere fünf Gene, die in ihrer Expression stark reprimiert waren. Interessanterweise liegen diese Gene auf Chromosom V in der Nähe des *AtPPT1*-Lokus. Mittels PCR-Analyse konnten die zugehörigen Genloci im Wildtyp und *cue1-6*, aber nicht in *cue1-1* nachgewiesen werden (s. Abb. 3.10.1.2). Somit scheint die Mutagenese in *cue1-1* sowohl

zu einer Deletion in *PPT1* als auch in mindestens fünf weiteren Genen geführt zu haben. Der zusätzliche Funktionsverlust dieser Gene (s. Tab. 3.10.1.2) könnte weitere Deregulierungen im *cue1-1* Expressionsprofil verursacht haben. Schon aufgrund der Unterschiede im Genotyp am *AtPPT1*-Lokus sowie im Wildtyphintergrund kann die *cue1-1* Mutante nicht direkt mit den anderen *cue1*-Allelen wie *cue1-6* verglichen werden. Es stellt sich die Frage, ob sich die Deletion weiterer Bereiche zusätzlich auf das Stoffwechselgeschehen in *cue1-1* auswirkt und die physiologischen und morphologischen Abweichungen von *cue1-1* gegenüber *cue1-6* verstärkt. Aus den bisherigen Erkenntnissen kann nicht klar abgeleitet werden, warum die Retardierung des Wurzelwachstums in *cue1-1* gegenüber *cue1-6* stärker ausgeprägt ist (s. 3.2) und inwiefern dies auf die bereits erwähnten Unterschiede wie den Ökotyp der Mutanten zurückzuführen ist.

Die *cue1*-Mutanten weisen eine eingeschränkte Photosyntheseleistung und Beeinträchtigungen im Calvin-Zyklus auf (Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003). Somit wäre eine starke Deregulierung von Genen der Licht- und Dunkelreaktion in *cue1-1* im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten. Jedoch zeigte sich, dass nur 1% aller in *cue1-1* deregulierten Gene im weiteren Sinne der Photosynthese zuzuordnen sind. Wie zu vermuten war, handelte es sich hauptsächlich um Gene, die in die Lichtreaktion der Photosynthese (LHCII) eingebunden und in *cue1-1* gegenüber pOCA herunterreguliert waren. Weiterhin konnten Veränderungen in der Expression einiger Gene aus *PPT1* nachgeschalteten Stoffwechselwegen wie die Synthese von Phenylpropanen festgestellt werden. Jedoch fällt auf, dass die Genexpression innerhalb anderer Funktionsbereiche wie Stress, Signaltransduktion, RNA-Regulation und Hormonstoffwechsel in *cue1-1* insgesamt stärker ($\log_2 > -2$) und zu einem höheren Anteil herabgesetzt war.

4.1.2.2 Auswirkungen der DCG-Fütterung auf die Expression in *cue1-1*

Die Anzucht der *cue1*-Mutanten in einem Zeitraum von 1-24 h in Gegenwart von DCG hatte eine Deregulierung von insgesamt 1561 Genen zur Folge. Es ist zu vermuten, dass einige dieser Veränderungen eine Folge von Stressreaktionen sind, die aufgrund der Verwundung durch Entfernen der Wurzel ausgelöst wurden. Dabei könnte die Stressantwort in *cue1* im Vergleich zum Wildtyp möglicherweise verzögert oder auch beschleunigt sein.

Es wurde festgestellt, dass ca. 15% aller Gene, deren Expression in *cue1-1* gegenüber pOCA verändert war, auch auf DCG ansprachen. Davon zeigten ca. 55% nach DCG-Fütterung eine gegenüber *cue1-1* entgegengesetzt gerichtete Deregulierung, d. h. die Gene, deren Expression in *cue1-1* reprimiert war, waren in den DCG-gefütterten Mutanten hochreguliert. Dies gewährte zunächst einen Einblick, welche Genfunktionen primär durch die Aufnahme von DCG in den Mutanten beeinflusst werden und erschließt möglicherweise auch Mechanismen, die in der *cue1*-Mutante beeinträchtigt sind. Einige Kandidatengene zeigten bereits nach ein- oder vierstündiger Anzucht in Gegenwart von DCG eine veränderte Expression, der Großteil der untersuchten Gene war hingegen erst nach 24-stündiger Anzucht in Gegenwart von DCG dereguliert. Für keines der Gene konnte eine kontinuierliche Deregulierung zu allen drei Zeitpunkten der DCG-Fütterung nachgewiesen werden.

Da der aberrante *cue1*-Blattphänotyp durch DCG revertiert werden konnte, wäre zu erwarten, dass Gene, die in *cue1* herunterreguliert und in *PPT1*-nachgeschalteten Reaktionen eingebunden sind, auf DCG ansprechen. Einige dieser Gene fungieren innerhalb des Phenylpropanstoffwechsels wie die Synthese von Flavonoiden und Anthocyanen. Auch die Expression von Genen aus dem Fettsäurestoffwechsel war in *cue1-1* gegenüber pOCA herabgesetzt und in den DCG-gefütterten Mutanten (24 h) hochreguliert. Die Expressionsdaten wiesen außerdem auf eine mögliche Beteiligung von Transkriptionsfaktoren hin, die jedoch nicht näher klassifiziert wurden.

Weiterhin zeigte sich, dass einige der in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung unterschiedlich deregulierten Gene in den Stoffwechsel von Phytohormonen wie Auxin und Ethylen eingebunden sind. Aufgrund der z. B. in Tabak von Teutonico et al. (1991) nachgewiesenen hormonellen Wechselwirkung von DCG mit Cytokininen, wäre auch eine synergistische oder antagonistische Wirkung von DCG mit anderen Phytohormonen zu vermuten. Nach DCG-Fütterung waren insgesamt 48 Gene aus dem Bereich des Hormonstoffwechsels in der Expression verändert. Interessanterweise konnten fast 50% dieser Gene eine Funktion innerhalb des Auxinstoffwechsels, aber keines der Gene eine Rolle im Metabolismus von Cytokininen zugewiesen werden. Im Gegensatz zu Cytokinin konnte der *cue1*-Phänotyp durch Fütterung der *cue1*-Mutanten mit Auxin-Analoga wie NAA nicht revertiert werden. Als N⁶-substituierte Adeninderivate lassen Cytokinine zunächst keinen direkten Zusammenhang zu AtPPT1 und nachgeschalteten Reaktionswegen vermuten, während Tryptophan als Produkt des Shikimatweges in die Synthese von Auxinen eingeht. Aufgrund der Beobachtung, dass in Tryptophan-Synthase-

defizienten Mutanten aus *A. thaliana* höhere Gehalte an IAA im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden konnten (Normanly et al., 1993), wurde die Existenz eines Tryptophan-unabhängigen IAA-Syntheseweges postuliert, bei dem Indol direkt in die Synthese von IAA eingeht (Wright et al., 1991; Ljung et al., 2002; Cohen et al., 2003). Jedoch ist bisher kein Enzym isoliert und charakterisiert worden, das an diesem Stoffwechselweg beteiligt sein könnte (Pollmann et al., 2006).

Ein Gen (At3g44300), welches für die *Nitrilase 2* (*NIT2*) kodiert, war in der *cue1-1* Rosette herabgesetzt und nach einstündiger DCG-Fütterung hochreguliert. Bei *NIT2* handelt es sich um eines der vier Mitglieder der *Nitrilase*-Familie, von denen *NIT1-NIT3* eine hohe Aminosäureidentität von > 82% aufweisen und auf Chromosom III lokalisiert sind. *NIT4* befindet sich auf Chromosom V mit einer Homologie von 65% zu den anderen drei Isoformen (Bartling et al., 1992; Bartel und Fink, 1994). Wie *NIT1* und *NIT3*, katalysiert auch *NIT2* die Bildung von IAA aus Indol-3-Acetonitril (IAN) (Bartling et al., 1992, 1994). Die Funktion dieser Enzyme scheint jedoch nicht auf die *de novo* Synthese von Auxin beschränkt zu sein (Vorwerk et al., 2001). *NIT1-NIT3* sind in den Abbau von IAN während der Umsetzung von Glucosinolaten eingebunden und werden z. B. bei Sulfatmangel aktiviert (*NIT3*: Kutz et al., 2002). Für *NIT2* wurde eine Beteiligung in der bedarfsorientierten Akkumulation zusätzlicher Mengen an IAA als Antwort auf Pathogene postuliert (Bartel und Fink, 1994; Grsic-Rausch et al., 2000).

Die Expressionsdaten in *cue1-1* gegenüber Wildtyp und nach DCG-Fütterung weisen auf eine Deregulierung weiterer Gene aus dem Auxinstoffwechsel hin. Die Bildung von Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) aus Tryptophan wird von den Cytochrom P450s CYP79B2 und CYP79B3 reguliert (Zhao et al., 2002). Eine leicht erhöhte Expression von CYP79B2 ($\log_2 = 0,39$) wurde nach einstündiger DCG-Fütterung beobachtet. Sowohl in Blättern als auch in Wurzeln von *cue1-1* sowie nach DCG-Fütterung waren einige Gene der Cytochrom P450-Familie z. T. stark herunterreguliert. Jedoch war nur ein Gen (At3g26280; CYP71B4) nach DCG-Fütterung im Vergleich zur Expression in *cue1-1* in die entgegengesetzte Richtung dereguliert. Hier war die Expression in der *cue1-1* Blattrosette in einem Verhältnis von $\log_2 = -1,05$ verringert und 24 h nach DCG-Fütterung um $\log_2 = 0,61$ hochreguliert.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit waren keine Informationen hinsichtlich der Auxingehalte in *cue1* im Vergleich zum Wildtyp verfügbar, die auf eine mögliche Beeinträchtigung der Auxinsynthese schließen lassen. Die Gehalte an Tryptophan sind in der *cue1*-Mutante gegenüber Wildtypkontrollen kaum verändert, z. T. sogar leicht erhöht

(Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003). Eine eingeschränkte Auxinsynthese aufgrund von Limitationen in der Bereitstellung von Tryptophan ist somit nicht zu vermuten. Jedoch wurden die Gehalte an aromatischen Aminosäuren bisher nur in Blättern der *cue1*-Mutante bestimmt (Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003). AtPPT2, der im Rahmen dieser Arbeit als funktioneller PEP-Transporter charakterisiert wurde (s. 3.1), ist in der Wurzel nicht aktiv. Somit gewinnt der AtPPT1 für die Bereitstellung an Vorstufen aus nachgeschalteten Stoffwechselwegen vor allem in diesen Geweben an Bedeutung.

Für drei weitere, in den Auxinstoffwechsel eingebundenen Gene, wurde eine unterschiedlich regulierte Expression in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung beobachtet. Eines dieser Gene kodiert für einen putativen TCP-Transkriptionsfaktor, At3g47620, der in *cue1-1* Blättern herunter- und nach 24 h in Gegenwart von DCG hochreguliert war. Die TCP-Gene weisen Funktionen im Bereich Zellteilung und Wachstum auf und können regulierend in die Blattmorphogenese eingreifen (Cubas et al., 1999; Li et al., 2005; Qin et al., 2005; Hay et al., 2006).

Weiterhin zeigten die Expressionsdaten, dass ein Gen aus der Auxin-Effluxtransporter-Familie (At2g17500) in *cue1-1* Blattrosetten herunterreguliert war. Nach einstündiger DCG-Fütterung konnte eine induzierte Expression festgestellt werden, die jedoch nach 4 h wieder in die entgegengesetzte Richtung dereguliert war. Als Komponenten des Auxin-Effluxtransporters, scheinen die PIN-Proteine in einem Multienzymkomplex eingebunden zu sein (Petrasek et al., 2006; Paciorek und Friml, 2006). Durch ihre polare Anordnung geben sie die Richtung des Auxinflusses vor (Wisniewska et al., 2006). Sowohl die Transkription der *PIN*-Gene (Vieten et al., 2005), als auch ihre Polarität kann zelltypspezifisch durch Auxin reguliert werden (*PIN1-2*, Sauer et al., 2006). Studien an *transparent testa (tt)* Mutanten aus *A. thaliana*, wiesen daraufhin, dass der *PIN*-vermittelte Auxintransport durch Flavonoide beeinflusst werden kann (Peer et al., 2004). In *tt4*-Keimlingen, in denen die Flavonoidsynthese durch einen Defekt der Chalkonsynthese blockiert ist, wurde ein verstärkter Auxintransport im Spross, in Infloreszenzen (Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001) und in der Wurzel (Buer und Muday, 2004) festgestellt. Die in der *tt4*-Mutante defekte Chalkonsynthese, At5g13930, und die in der *tt5*-Mutante funktionell beeinträchtigte Chalkonisomerase, At3g55120, waren in *cue1-1* Rosetten hochreguliert und nach DCG-Fütterung reprimiert (s. Anhang 8.1). Dies könnte zu einer verstärkten Synthese bestimmter Flavonoide führen, die den Auxintransport in bestimmten Zelltypen der *cue1*-Mutante negativ beeinflussen. In *cue1-1* Blattgeweben wurde ein verändertes Spektrum an Flavonoiden wie Quercetin und Kaempferolderivaten festgestellt

(Voll et al., 2003), deren aktiven Aglyka eine Bedeutung bei der Regulation des Auxintransports zugeschrieben werden (Peer et al., 2001). In der Wurzel konnten keine signifikanten Veränderungen im Flavonoidgehalt der *cue1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (s. 3.13.1), jedoch ist auch hier eine spezifische Deregulierung einzelner Flavonoidkomponenten denkbar.

Insgesamt gesehen weisen die Expressionsdaten auf Störungen innerhalb der komplexen Signalkette von Auxinen in der *cue1*-Mutante hin. Unter der Berücksichtigung, dass einige der in *cue1* deregulierten Gene im Zuge der Reversion des retikulierten Phänotyps durch DCG-Fütterung in die entgegengesetzte Richtung dereguliert waren, könnte ihnen eine Bedeutung innerhalb der in *cue1* gestörten Entwicklungsprozesse zukommen. Die externe Zugabe von Auxin zur *cue1*-Mutante hatte jedoch keine Auswirkung auf den *cue1*-Blattphänotyp (s. 3.8).

4.1.2.3 Ist die *cue1*-Mutante Cytokinin-insensitiv?

Ausser durch die externe Zugabe aromatischer Aminosäuren oder DCG, konnte auch durch trans-Zeatin eine Reversion des retikulierten Blattphänotyps in der *cue1*-Mutante bewirkt werden. Es stellte sich daher die Frage, ob Gene, die auf Cytokinine ansprechen, in der *cue1*-Mutante selektiv dereguliert sind. Durch einen Vergleich von genomweiten Expressionsanalysen nach Cytokinin-Fütterung (Col-0 BA (Benzyladenin), 120 min) sowie von Cytokinin-defizienten Pflanzen (Cytokininoxidase (CKX)-Überexprimierer) (Brenner et al., 2005) mit *cue1-1*, konnte dieser Aspekt näher beleuchtet werden (s. Tab. 4.1). Dabei war auffällig, dass die Expression zahlreicher Gene in *cue1* und in den Cytokinin-defizienten Mutanten in die gleiche Richtung verändert, bzw. in beiden Fällen reprimiert oder induziert wurde. Hingegen schien ein großer Anteil der Gene, die auf Fütterung mit BA ansprachen, gegenüber *cue1* in die entgegengesetzte Richtung dereguliert zu sein. Interessanterweise wurden diese Verhältnisse nach DCG Fütterung (24 h) revertiert und spiegeln somit das „Verschwinden“ des retikulierten Blattphänotyps wider. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass in *cue1* Cytokininmangel angezeigt wird.

Einige der Gene, die in den Cytokinin-defizienten Linien und nach Cytokininfütterung gegensätzlich dereguliert waren, sind in den Trehalose-Metabolismus eingebunden (Brenner et al., 2005; Abb. 4.1). Diese Gene zeigten in *cue1* eine Richtung der

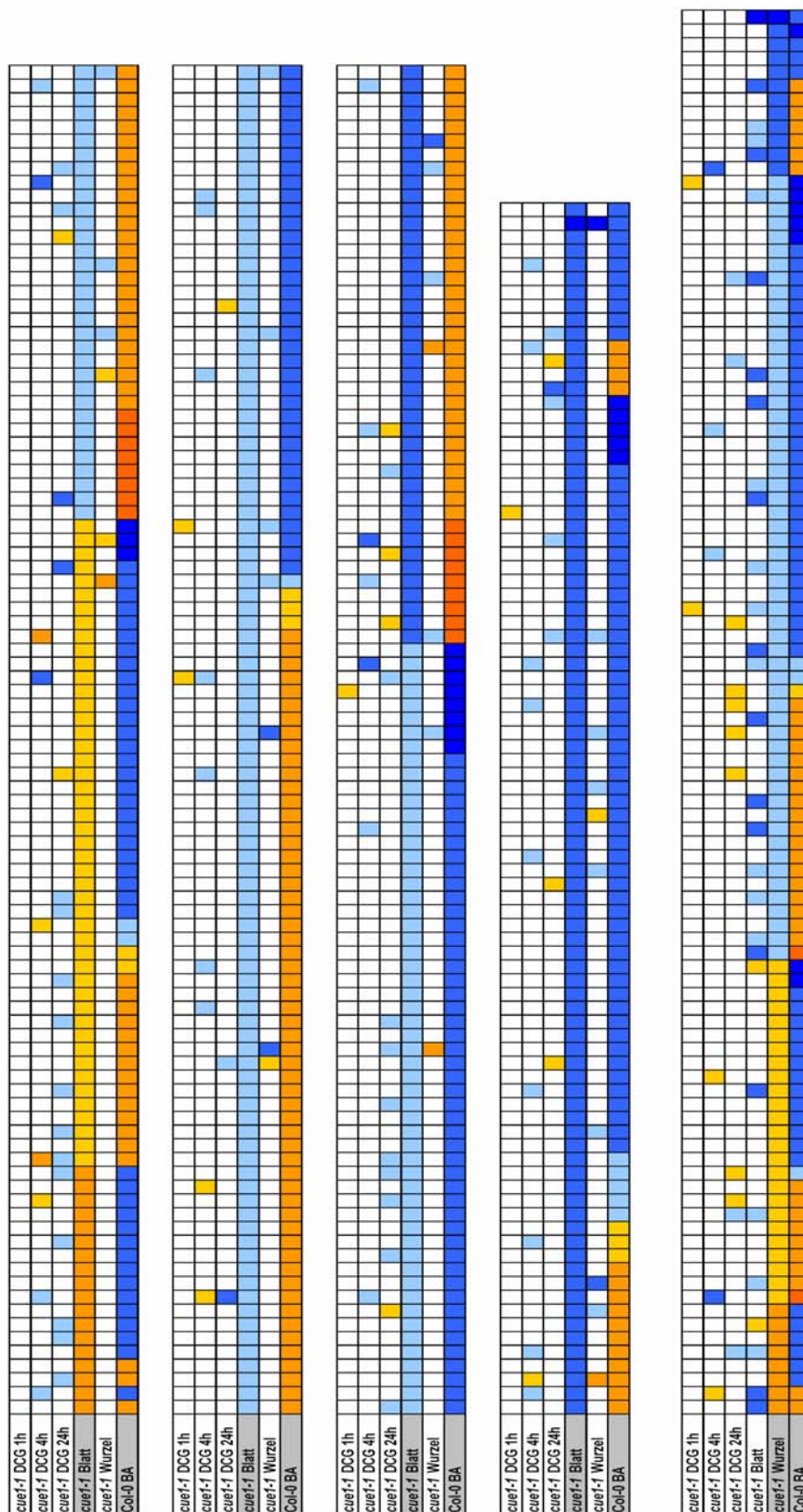
Deregulierung an, die auf einen Cytokininmangel in der Mutante hinweist (Tab. 4.2). Dabei handelte es sich um Gene aus der Familie der Trehalose-6-Phosphat-Synthase, TPS8, TPS9, TPS10 und TPS11, die in Col-0 nach Cytokininfütterung hochreguliert und in den Blattrosetten von *cue1-1* herunterreguliert waren. Trehalose dient speziell in „Wiederauferstehungs“-Pflanzen zum Schutz gegen Austrocknung (Wingler, 2002). In anderen Pflanzenarten wie *A. thaliana* scheint Trehalose-6-Phosphat (T6P) als Intermediat des Trehalose-Stoffwechsels ein essentielles Steuerelement in der Verwertung von Kohlenhydraten zu sein und regulierend in Wachstum und Entwicklung der Pflanze einzugreifen (Schlupmann et al., 2003). Durch den Vergleich der Expressionsdaten in *cue1-1* mit denen von Mutanten, die *TPS*, *TPP* oder *TPH* aus *E. coli* im Col-0 Hintergrund exprimieren (Schlupmann et al., 2003, 2004), wurde festgestellt, dass ein sehr großer Anteil der Gene in *cue1* und in den transgenen Linien mit manipuliertem Trehalose-Metabolismus in die entgegengesetzte Richtung dereguliert war (Tab. 4.3). Die Expression von *TPS*, *TPP* und *TPH* führt zu einer Akkumulation unterschiedlicher Intermediate des Trehalose-Stoffwechsels, z. B. sind die Gehalte an T6P in den *TPP*- und *TPH*-Überexprimierern verringert. Dies wäre auch in *cue1-1* zu erwarten gewesen, da einige *TPS*-Gene in der Mutante herunterreguliert sind. Jedoch zeigt die *cue1*-Mutante auch gegenüber diesen Überexprimierern allgemein eine entgegengesetzt deregulierte Genexpression.

Entgegen den aus den Microarray-Analysen abgeleiteten Beobachtungen, die einen Cytokininmangel in *cue1* möglich erscheinen lassen, wurden in den *cue1*-Mutanten aber insgesamt höhere Gehalte an Cytokinin gemessen. In der Wurzel war der Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp besonders deutlich. Hier waren die Gehalte an aktiven Cytokinin wie trans-Zeatin, Isopentenyladenin und Benzylaminopurin 2-fach, andere Substanzen sogar 3 bis 4-fach gegenüber dem Wildtyp erhöht. Die *cue1*-Mutante scheint daher Cytokinin-insensitiv zu sein. Möglicherweise ist ein Defekt in der Erkennung und Weiterleitung der durch Cytokinin ausgelösten „Signale“ für die Ausbildung des retikulierten Phänotyps in *cue1* verantwortlich. Die in *cue1* nachgewiesenen Defekte der Plastidenentwicklung und z. B. die Unfähigkeit, Anthocyane zu bilden, könnten aus einer Störung innerhalb der Cytokinin-Antwort resultieren. Ein Defekt in der Cytokinin-Erkennung scheint auch in *albostrans*-Mutanten aus Gerste vorzuliegen, die einen chlorotischen Blattphänotyp durch eine Blockade in der Plastidenentwicklung zeigen (Kulaeva et al., 2002). Diese weisen in den bleichen Blattbereichen höhere Gehalte an Cytokinin auf. Die Frage bleibt offen, welche Stufe der Cytokininsignalkette in *cue1*

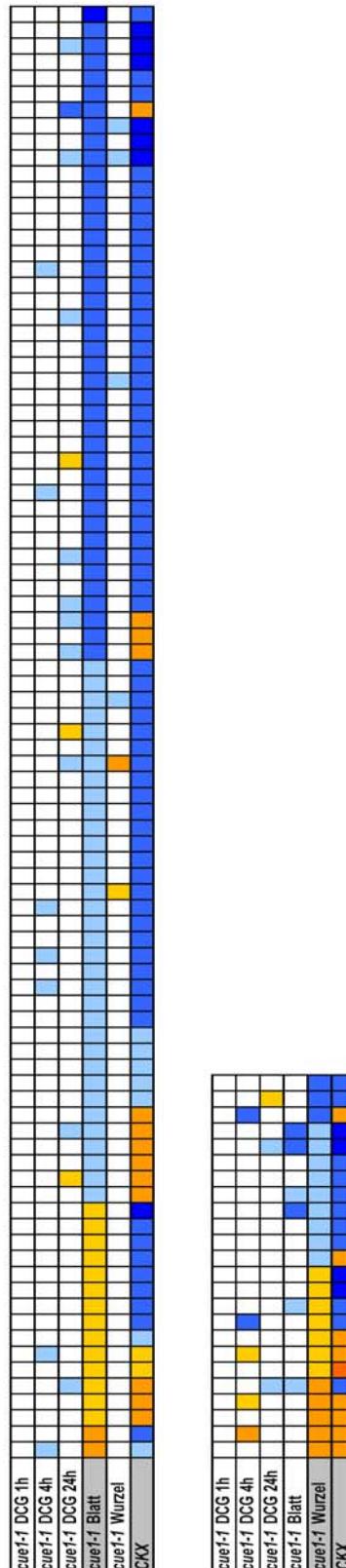
gestört ist. Die Expressionsdaten in *cue1-1* geben keine eindeutigen Hinweise auf eine Deregulierung von Cytokinin-Rezeptoren (CRE/AHKs) oder Cytokinin-„response“-Regulatoren (ARRs), die mit Veränderungen des Phänotyps einhergehen. Somit sind weitere Untersuchungen nötig, um diesen Aspekt zu klären.

Es bleibt die Frage, warum bei erhöhten endogenen Cytokiningehalten in der *cue1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp eine externe Zugabe von Cytokinin wie trans-Zeatin und Kinetin eine Kurierung des *cue1*-Phänotyps zur Folge hatte. Möglicherweise könnte eine verstärkte Expression der *AtPPDK* die Reversion des Phänotyps begünstigt haben. In Studien von Voll et al. (2003) wurde der retikulierte *cue1*-Blattphänotyp durch Überexpression der *PPDK* aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia* komplementiert. Zudem hatte die Fütterung von Col-0 mit BA eine erhöhte Expression der *AtPPDK* zur Folge (Brenner et al., 2005). Dieser Aspekt könnte z. B. durch Fütterung der *ppdk* x *cue1-1* Doppelmutanten mit Zeatin näher untersucht werden.

Tab. 4.1 A: Darstellung der deregulierten Gene in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung im Vergleich mit den Expressionsdaten nach Cytokininfütterung (Brenner et al., 2005), sortiert nach *cue1-1* Blattrosette bzw. nach *cue1-1* Wurzel



Tab. 4.1 B: Darstellung der deregulierten Gene in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung im Vergleich mit den Expressionsdaten der Cytokininoxidase-Überexprimierer (Brenner et al., 2005); sortiert nach *cue1-1* Blattrosette bzw. nach *cue1-1* Wurzel

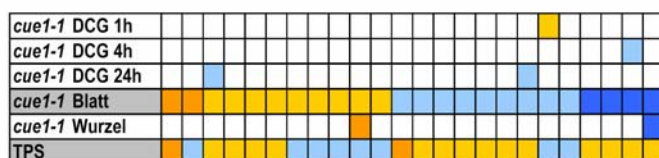
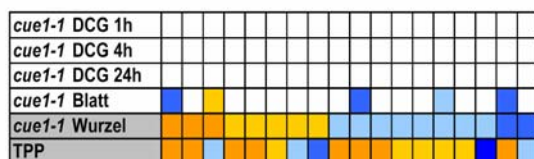
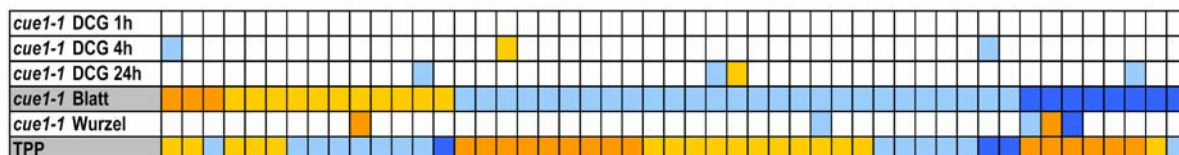
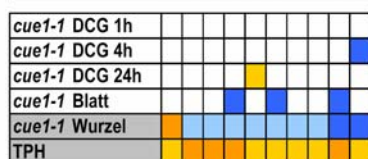


Tab. 4.2: Auswahl deregulierter Gene in *cue1-1* Blattrosetten und nach Cytokininfütterung (Col-0 120 min BA)

AGIcode	<i>cue1-1</i> leaves	Col-0 BA	Function	Detailed description
At1g70290	-2,02	2,14	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS/TPP	TPS8, trehalose-6-phosphate synthase
At2g18700	-1,94	3,05	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS/TPP	TPS11, putative trehalose-6-phosphate synthase
At1g60140	-0,98	1,97	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS/TPP	TPS10, trehalose-6-phosphate synthase
At1g23870	-0,73	1,83	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS/TPP	TPS9, trehalose 6-phosphate synthase

Tab. 4.3: Vergleich der deregulierten Gene in *cue1-1* Blattrosetten und Wurzeln mit Microarraydaten von Pflanzenlinien, die TPS, TPP oder TPH aus *E.coli* im Col-0 Hintergrund exprimieren (Schluepmann et al., 2003, 2004)

log > 3 log > 1 log > 0,5 log < -0,5 log < -1 log < -3



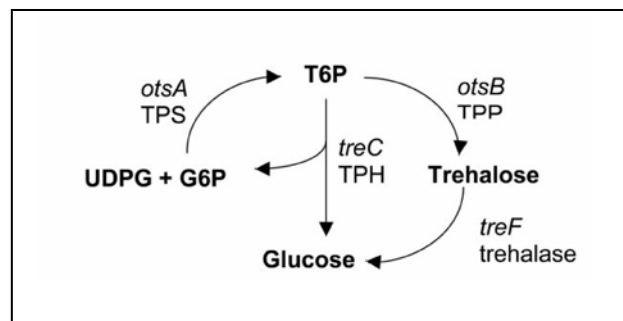


Abb. 4.1: Der Trehalose-Stoffwechsel in *E. coli* (aus Schluepmann et al., 2003)
 $otsA$ kodiert für eine Trehalose-Phosphat-Synthase (TPS), $otsB$ für Trehalose-Phosphat-Phosphatase, $treC$ für Trehalose-Phosphat-Hydrolase (TPH) und $treF$ für Trehalase

4.1.2.4 Ethanol-induziertes RNAi für *AtPPT1*

Die Möglichkeit, den retikulierten *cueI*-Phänotyp mit Hilfe eines Ethanol-induzierbaren RNAi-Systems im Col-0 Hintergrund transient zu generieren, stellte einen weiteren Ansatz dar, um die Vorgänge, die durch den Funktionsverlust des *AtPPT1* ausgelöst werden und die Mesophyllentwicklung betreffen, zu klären. Durch die Reduktion der *AtPPT1*-Transkriptmenge, die mittels RT-PCR-Analyse überprüft wurde, konnte der *cueI*-Blattphänotyp in den Col-0/*alcA:PPT1*RNAi-Transformanten erzeugt werden. Auffallend war, dass die sich neu entwickelnden Rosettenblätter einen retikulierten Phänotyp ausprägten, während die bereits ausgebildeten, älteren Blätter größtenteils unverändert blieben. Mittels RT-PCR-Analyse wurde zu diesem Zeitpunkt nach ca. 168-stündiger Anzucht auf Ethanol noch ein schwaches Signal für *PPT1* detektiert. Dass die Pflanzen trotz Repression des *AtPPT1* keinen einheitlich retikulierten Phänotyp ausprägten, ist möglicherweise auf die Stabilität des PPT-Proteins zurückzuführen. Daher wurde der Zeitpunkt der De-Repression des *AtPPT1*, der in einer Reversion des retikulierten *cueI*-Phänotyps resultierte, für eine genomweite Expressionsanalyse ausgewählt. Der Ethanol-Entzug führte zu einer Erhöhung der *AtPPT1*-Transkriptmenge. Hier wurde beobachtet, dass sich nicht nur die jungen Blätter normal entwickelten, sondern auch die Rosettenblätter, die zuvor den *cueI*-Phänotyp ausprägten, eine langsame Rückentwicklung vollzogen hatten. Für weitere Analysen war der Zeitpunkt vor Beginn der sichtbaren

Reversion des retikulierten Phänotyps relevant, um die Prozesse näher zu beleuchten, die primär durch Wiedererlangung der *PPT1*-Funktion ausgelöst wurden.

Die genomweite Expressionsanalyse zeigte, dass allein die Behandlung mit Ethanol z. T. starke Veränderungen in der Genexpression der Pflanzen zur Folge hatte. Ein Ethanol-induzierbares System ist für vergleichende Expressionsanalysen daher wenig geeignet, wenn die EtOH-Behandlung wie in den hier durchgeführten Versuchsreihen über längere Zeit erfolgt. Bei den hier dargelegten Untersuchungen wurden diese Ethanol-Effekte mit Hilfe entsprechender Kontrollen berücksichtigt. Wie erwartet, konnte die herabgesetzte *AtPPT1*-Expression nach 168 h Ethanol-Induktion mittels Arrayanalyse nachgewiesen werden. Da dies nicht zu einem vollständigen *knock-out* führte, war *PPT1* in den induzierten Linien nicht so stark dereguliert wie in *cue1-1*. Nach 120 h Ethanol-Entzug war die *PPT1*-Expression gegenüber EtOH-induzierten Pflanzen zwar um ca. 150% erhöht, aber noch halb so stark wie im Wildtyp. Durch Gegenüberstellung der Daten aus den verschiedenen Arrayanalysen, fielen einige Gene auf, die in *cue1-1* und nach *AtPPT1*-Repression in Col-0/*alcA:PPT1*RNAi gemeinsam herunterreguliert waren und nach 72 h Ethanol-Entzug sowie nach DCG-Fütterung eine erhöhte Expression zeigten. Die in 4.1.2.2 bereits erwähnte *Nitrilase 2* war sowohl in *cue1-1* als auch infolge der *AtPPT1*-Repression durch den induzierbaren RNAi-Ansatz herunterreguliert, zeigte aber eine erhöhte Expression nach 72 h und 120 h Ethanol-Entzug und bereits nach einstündiger DCG-Fütterung. Die sehr hohe Repression dieses Gens in den induzierten Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien ist z. T. durch den starken Ethanol-Effekt zu erklären (Tab. 3.10.3.2). Für das Gen, welches für einen potentiellen Auxin-Effluxtransporter kodiert (At2g17500), wurde eine ähnliche Entwicklung festgestellt. Interessanterweise ist dieses Gen in Cytokinin-behandelten Mutanten hochreguliert (Brenner et al., 2005). Eine starke Induktion ($\log_2 > 3$) in den BA-behandelten Col-0 Linien konnte für ein Gen mit potentieller Plastocyanin-Funktion festgestellt werden (At5g20230), welches sowohl in *cue1-1* als auch in den induzierten Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien herunterreguliert war. Jedoch löste der Ethanol-Effekt in den Kontrolllinien bereits eine höhere Deregulierung aus als die *AtPPT1*-Repression. Im Zeitraum von 72 h und 120 h nach Ethanol-Entzug war die Genexpression hochreguliert. Diese Beobachtungen unterstützen die bereits erwähnte Vermutung, dass der in *cue1* beeinträchtigte Signalweg möglicherweise durch Cytokinine angesteuert wird. Die mögliche Beeinträchtigung in der Bereitstellung an Plastocyanin korreliert mit der in *cue1-1* gegenüber Kontrollen um 60% verringerten Elektronentransportrate des PSII (Voll et al., 2003). Die Expression zweier Gene aus dem

Sekundärstoffwechsel, die möglicherweise in die Alkaloidsynthese eingebunden sind, waren in *cue1-1* und in den induzierten Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien herabgesetzt und nach 72 h infolge der De-Repression des *AtPPT1* hochreguliert (Tab. 3.10.4.2). Durch Anzucht der Mutanten in Gegenwart von DCG wurde die Expression dieser Gene jedoch nicht induziert, sondern nach 24 h leicht verringert. Eine Reihe von Aminosäuren wie die aromatischen AS können als Vorstufen in die Synthese von Alkaloiden eingehen. Obwohl Alkaloiden in Brassicaceae bisher nur eine geringe Bedeutung zugeschrieben wurde, konnte in *A. thaliana* eine Reihe von homologen Enzymen aus der Alkaloidbiosynthese gefunden werden (Fabbri et al., 2000; Facchini et al., 2004). Eines der deregulierten Gene, At2g29350, kodiert für eine potentielle Tropinonreduktase, ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Tropan-Alkaloiden (Nakajima et al., 1998). Es ist identisch mit *AtSAG13* (*senescence-associated gene*), welches in den hochregulierten Prozess der Seneszenz eingebunden ist (Weaver et al., 1998). In Studien von Miller et al. (1999) konnte festgestellt werden, dass die *AtSAG13* Expression infolge einer durch Ozon ausgelösten Blattseneszenz induziert wird.

Die Bedeutung von MYB-Faktoren bei der Expression von Genen, die in den Phenylpropanstoffwechsel eingebunden sind, wurde mit der Ausbildung eines retikulierten Phänotyps transgener Tabakpflanzen in Zusammenhang gesetzt (Tamagnone et al., 1998a, b). Somit könnte der Nachweis einer funktionellen Einschränkung dieser Transkriptionsfaktoren auch zur Klärung des *cue1*-Phänotyps beitragen. Ein MYB-Faktor vom R-R-Typ (At5g04760; Yanhui et al., 2006) war in *cue1-1* und infolge der RNAi-vermittelten *AtPPT1*-Repression reprimiert und nach 72 h Ethanol-Entzug leicht hochreguliert. Dagegen war die Expression nach DCG-Fütterung (1 h) leicht herabgesetzt. Weitere MYB-Faktoren waren in ähnlicher Weise dereguliert. Um nähere Hinweise hinsichtlich einer möglichen Bedeutung dieser Faktoren in der Mesophyllentwicklung liefern zu können, wären weiterführende Untersuchungen notwendig, die im folgenden „Ausblick“ angesprochen werden.

4.1.2.5 Ausblick

Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalyse lieferten Hinweise, welche Gene bzw. Genbereiche in den Signalweg eingebunden sein könnten, der in *cue1* beeinträchtigt ist. Die Deregulierungen im Expressionsprofil der *cue1*-Mutante deuten auf eine Störung in

einer von Cytokinin- oder Auxin-angesteuerten Signaltransduktionskette hin. Aufgrund der Vermutung, dass *cue1* Cytokinin-insensitiv ist, wäre eine Beeinträchtigung stromabwärts des Cytokinin-Signals zu erwarten. Dabei könnte der Einfluss von Auxinen eine Rolle spielen. Aufgrund der Funktion einiger Phenylpropane, die Signalwege dieser Phytohormone zu modulieren, könnte ein Zusammenhang zu den durch den AtPPT1-Funktionsverlust verursachten Limitationen dieser Signalkomponenten und den Beeinträchtigungen in der Mesophyllentwicklung der *cue1*-Mutante hergestellt werden. Die Arraydaten liefern eine Auswahl an „Kandidatengenen“, deren Bedeutung für diesen Prozess durch Überexpression der Gene oder mit Hilfe von *knock-out* Linien näher untersucht werden könnte. Dadurch würde auch die Funktion einiger Gene näher beleuchtet, die bisher noch nicht charakterisiert wurden, aber möglicherweise Teil der noch unbekannten Signalkette sind. Weiterhin muss geklärt werden, in welchem Gewebe der Pflanze das fehlende Signal erzeugt wird. Die Hypothese, dass ein Signalmetabolit in der Wurzel produziert und in den Spross transportiert wird, konnte durch die in 3.5 gezeigten Pfropfungsexperimente widerlegt werden.

4.1.3 Die Reversion des *cue1*-Phänotyps durch Überexpression der Nicotianaminsynthase

Durch „*Activation tagging*“ konnte eine T-DNA-Insertionslinie im *cue1-1* Hintergrund isoliert werden, bei der der retikulierte Blattphänotyp revertiert war. Nach Ermittlung der T-DNA-Insertionsstelle im Genom dieser Mutante und einer anschließenden Expressionsanalyse der benachbarten Genbereiche, konnte eine verstärkte Expression eines Gens festgestellt werden, das für eine Nicotianaminsynthase (NAS1; At5g04950) kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Nicotianamin (NA), einem Polyamin, welches aus drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin aufgebaut ist (Kawai et al., 1988; Shojima et al., 1989). Nicotianamin ist als Metall-Chelator in die Regulation der Eisenaufnahme eingebunden (Scholz et al., 1992; Herbig et al., 1999; Higuchi et al., 1999; Takahashi et al., 2003; Bauer et al., 2004) und scheint bei der Detoxifikation von Metallen wie Nickel eine Rolle zu spielen (Kim et al., 2005). Störungen in der Aufnahme und im Transport von Eisen können Eisenmangelsymptome wie interkostale Chlorose hervorrufen, wie anhand

verschiedener Mutanten aufgezeigt wurde (Ling et al., 1999; Takahashi et al., 2003; Waters et al., 2006).

Die Proteine der *Yellow Stripe-Like* Familie (YSL) fungieren als Transporter der Fe(II)-NA-Komplexe (DiDonato et al., 2004). Die *ysl1ysl3*-Doppelmutanten aus *A. thaliana* zeigen sowohl in jungen als auch in älteren Blättern interkostale Chlorose (Waters et al., 2006). Als physiologische Rolle von AtYSL1 und AtYSL3 wurde der Transport von Metallen in die Parenchymzellen des Leitgewebes zur weiteren Verteilung in die Mesophyllzellen reifer Blätter postuliert. Da die Expression beider Gene während der Seneszenz hochreguliert wird, könnte ihnen auch eine Bedeutung bei der Mobilisierung von Eisen und weiteren Metallen aus den seneszenten Blättern in andere Gewebe zugeschrieben werden (Himmelblau und Amasino, 2001; Waters et al., 2006). Die Expressionsdaten der induzierten Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien weisen auf eine leicht herabgesetzte Expression der *AtYSL1-3* hin, jedoch konnte keine Deregelierung in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA festgestellt werden.

Die Mutation der in Ling et al. (1999) beschriebenen *chloronerva*-Mutante aus Tomaten resultierte in einen Funktionsverlust der Nicotianaminsynthese. Diese Mutante akkumuliert Eisen in allen Geweben, zeigt aber Eisenmangelsymptome wie interkostale Chlorose in jungen Blättern. Dieser chlorotische Phänotyp konnte durch externe Zugabe von Nicotianamin behoben werden. Die Existenz eines *single copy NAS* Gens im Genom von Tomaten könnte erklären, warum dieser chlorotische Phänotyp zuerst in dieser Pflanzenart aufgetreten ist (Douchkov et al., 2002). In *A. thaliana* wurden bereits vier Gene isoliert, die für eine Nicotianaminsynthese kodieren (Suzuki et al., 1999; Ushio et al., 2003). Im Hinblick der *AtNAS1*, die in den *cue1-1/35Sen1* Linien überexprimiert war, konnte mittels Microarray-Analyse keine Deregelierung in *cue1-1* festgestellt werden. Die RT-PCR-Analyse zeigte auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transkriptmengen in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA. Jedoch war die Genexpression in den induzierten Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien stark herabgesetzt ($\log_2 = -2,49$). Eine Überlappung der Werte durch den Ethanol-Effekt kann ausgeschlossen werden. In den Ethanol-behandelten Col-0 Kontrollen wurde keine Deregelierung des Gens festgestellt. Auch die De-Repression des *AtPPT1* und die Anwesenheit von DCG in *cue1-1* hatten keine Veränderungen in der Expression dieses Gens zur Folge. Die Expressionsdaten liefern somit keine eindeutigen Hinweise auf eine verringerte Expression der *AtNAS*-Gene in der *cue1-1* Mutante im Vergleich zu pOCA. Es stellt sich die Frage, ob die Bereitstellung von Polyaminen wie Nicotianamin in der *cue1*-Mutante limitiert ist.

Transgene Tabakpflanzen, die eine NA Aminotransferase (NAAT) aus Gerste überexprimieren, prägten einen *Chloronerva*-ähnlichen Blattphänotyp und eine abnorme Blütenform aus (Takahashi et al., 2003). Die Limitation in der Bereitstellung von NA führte in diesen Pflanzen zu Beeinträchtigungen innerhalb des Transportes von Metallen. Die Expressionsdaten in *cue1-1* und in den induzierten Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien zeigten, dass eine putative NAAT in der Expression herabgesetzt und infolge der *AtPPT1* De-Repression nach 72 h stark hochreguliert war (At2g24850; Tab. 3.10.3.2). Nach 120 h wurde wieder eine verringerte Expression festgestellt. Möglicherweise lässt sich diese Entwicklung durch die Anpassung der Mutanten an veränderte NA Gehalte erklären.

Interessanterweise zeigten Studien von Voll et al. (2003), dass die Gehalte an Polyaminen in *cue1-1* um bis zu 75% bis 95% gegenüber der Kontrolle verringert waren. Bei diesen Messungen wurden jedoch nur die Gehalte der in Pflanzen hauptsächlich vorkommenden Polyamine Putreszin, Spermidin und Spermin berücksichtigt. Jedoch ist auch eine Verminderung im Gehalt weiterer Polyamine wie NA in der Mutante zu vermuten, zumal *cue1-1* im Vergleich zu pOCA geringere Methionin-Gehalte aufweist (Voll et al., 2003) und Methionin als Endprodukt des Pyruvat-Aspartat-Weges in die Synthese von NA eingeht.

Polyamine zeigen Cytokinin-ähnliche Wirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze (Cohen et al., 1979; Galston et al., 1995) und sind möglicherweise in die Steuerung einer korrekten Plastidenentwicklung eingebunden (Legocka und Zarnovska, 1999; Dornemann et al., 1996). In Studien von Rakova und Romanov (2005) wurde festgestellt, dass Polyamine die Cytokinin-induzierte Expression auf posttranskriptionaler Ebene blockieren können. Als physiologische Funktion wurde die Regulation intrazellulärer Cytokiningehalte postuliert. Diese Beobachtung könnte auf einen Zusammenhang zwischen der reduzierten Synthese von Polyaminen und den stark erhöhten Cytokiningehalten in der *cue1*-Mutante hinweisen.

Interessanterweise war die *AtNAS1* in Cytokinin-defizienten Mutanten hochreguliert (Brenner et al., 2005). Somit ist eine gegenseitige Genregulierung im Bereich der Cytokinin- und Nicotianaminsynthese zu vermuten. Zudem werden die Funktionen der Cytokinine teilweise durch Ethylen vermittelt und Cytokinine können regulierend in die Ethylen-Synthese eingreifen (Cary et al., 1995). Nicotianamin und Ethylen haben S-adenosyl-Methionin als gemeinsame Vorstufe. Neben diesem kompetitiven Aspekt ist eine Interaktion der beiden Substanzen, vor allem bei Stress wie Eisenmangel, zu vermuten. Die

Präsenz einer putativen ERE (*ethylen-responsive element*)-ähnlichen Sequenz stromaufwärts der *AtNAS3* unterstützt diese Vermutung (Suzuki et al., 2001).

Um weitere Aussagen über die Bedeutung von Nicotianamin bei der Ausbildung des retikulierten Phänotyps in der *cue1*-Mutante treffen zu können, muss genau geklärt werden, ob die Reversion des retikulierten Phänotyps durch die Überexpression der *AtNAS1* initiiert wurde, oder ob der Einfluss möglicher weiterer T-DNA-Insertionen eine Rolle gespielt hat. Dieser Aspekt könnte durch die Expression der *AtNAS1* unter der Kontrolle eines 35S-Promoters im *cue1*-Hintergrund geklärt werden. Da keine Nachkommen der Revertante zur Verfügung standen, konnte diese transgene Linie nicht weiter untersucht werden. Die Umstände, die zum Verlust der Revertante geführt haben, bleiben unklar. Möglicherweise hatte der Eingriff in den Eisenhaushalt der Pflanze weitere Stressreaktionen zur Folge, die zu Nekrosen und letztendlich zum Absterben der gesamten Pflanze führten.

Im Hinblick auf weitere Untersuchungen zur Klärung der Rolle von Polyaminen in der Mesophyllentwicklung, sollte überprüft werden, ob der retikulierte Blattphänotyp neben der *AtNAS1*-Überexpression auch durch eine verstärkte Synthese weiterer Polyamine im *cue1*-Hintergrund komplementiert werden kann.

4.2 Welche Auswirkungen hat die Blockade weiterer Reaktionswege zur Bereitstellung von PEP im Plastidenstroma auf die Entwicklung der Pflanze?

4.2.1 Die Bedeutung der AtPPDK bei der Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg

Durch die PPDK kann Pyruvat in einer ATP-abhängigen Reaktion zu PEP umgesetzt werden (Carrol et al., 1994). In C₄-Pflanzen dient die PPDK als Schlüsselenzym der Photosynthese zur Anlieferung von PEP als primären CO₂-Akzeptor in Mesophyllzellen. Da diese Rolle der PPDK im C₃-Stoffwechsel entfällt, wurde dem Enzym bisher nur eine geringe Bedeutung bei der Bereitstellung von PEP in C₃-Pflanzen zugeschrieben. Jedoch lässt sich die PPDK-Aktivität auch in C₃-Pflanzen wie *A. thaliana* nachweisen. In Studien von C₄-Pflanzen (*Flaveria trinervia* - Rosche und Westhoff, 1995; *Zea mays* – Sheen,

1991) und C₃-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* - Parsley und Hibberd, 2006; *Oryza sativa* – Imaizumi et al., 1997), wurde festgestellt, dass die PPDK als *single copy* Gen vorliegt. Dieses besitzt zwei Promotoren für die Generierung von zwei unterschiedlich langen Transkripten, entsprechend einem plastidären und einem cytosolischen Protein. Das längere Transkript schließt das erste Exon ein, das als Transitpeptid des plastidären Proteins fungiert. Die Funktion der plastidär lokalisierten PPDK in C₃-Pflanzen wie *A. thaliana* und die der cytosolischen PPDK ist unklar. Es gibt nur wenige Informationen darüber, wie die PPDK-Expression reguliert wird. In Studien von Parsley und Hibberd (2006) konnte gezeigt werden, dass die alternativen AtPPDK-Proteine in unterschiedlichen Geweben akkumulieren. Während das kürzere Transkript für die cytosolische PPDK sowohl in Keimblättern, Petiolen, Blattrosetten, Sprossblättern und Blüten von *A. thaliana* zu finden ist, konnte das längere Transkript für das plastidäre Protein hauptsächlich in Sprossblättern und Blüten detektiert werden. Im Leitgewebe sind beide Transkripte präsent. Die Bedeutung der cytosolischen AtPPDK liegt möglicherweise in der Remobilisierung von Stickstoff aus seneszenten Blättern (Lin und Wu, 2004) und aus Sprossblättern während der Samenproduktion. Weiterhin wurde die Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die Glukoneogenese als Funktion der AtPPDK in Keimblättern postuliert (Parsley und Hibberd, 2006). Die Funktion der plastidären PPDK stellt neben dem PPT1 eine weitere Möglichkeit dar, PEP im Stroma für den Shikimatweg anzuliefern. Die Aktivität der endogenen plastidären AtPPDK scheint jedoch nicht auszureichen, die Limitationen in der Bereitstellung von PEP in der *cue1*-Mutante zu kompensieren. Dagegen konnte durch die stromagebundene Überexpression der PPDK aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia* der retikulierte Phänotyp der *cue1*-Mutante komplementiert werden (Voll et al., 2003). Die Expressionsmuster von PPDK (s. Abb. 4.2 B) und PPT1 (s. Abb. 4.2 A) zeigen, dass die Gene in verschiedenen Geweben und Wachstumsstadien von *Arabidopsis thaliana* exprimiert sind. Im Gegensatz zu AtPPT1 ist AtPPDK erst zu einem späteren Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung, während der Seneszenz aktiv und eine hohe Expression kann nur in Pollen festgestellt werden. Somit stellte sich die Frage, ob die endogene AtPPDK für die Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg eine Rolle spielt. Anhand von *ppdk*-Mutanten sowie *ppdk* x *cue1-1* Doppelmutanten wurde dieser Aspekt näher untersucht. Die *ppdk*-T-DNA-Mutante zeigte keinen offensichtlichen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (s. 3.12.2). Auch die *ppdk* x *cue1-1* Doppelmutanten zeigten keine zusätzlichen Einschränkungen im Wachstum oder blattphänotypische Veränderungen im Vergleich zu *cue1-1*. Jedoch wurde festgestellt, dass die Doppelmutanten teilweise längere

Wurzeln ausprägten als die *cue1*-Mutante. Dieser Effekt war nicht zu erwarten, zumal die AtPPDK in Wurzeln nicht exprimiert ist (s. Abb. 4.2 B). Weiterhin wurde beobachtet, dass *PPDK*-überexprimierende Linien (Col-0/35S:PPDK) teilweise kürzere Wurzeln ausprägten als der Wildtyp, obwohl zwischen Col-0 und der *ppdk*-Mutante sowie zwischen *cue1-6* und *cue1-6/35S:PPDK* Linien keine Abweichungen in der Wurzellänge festzustellen waren. Dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht, könnte aber in weiteren Studien berücksichtigt werden. Zudem sollte erwähnt werden, dass die *ppdk*-Mutante mehrere T-DNA-Insertionen trägt, die einen zusätzlichen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze haben könnten.

Die genomweite Expressionsanalyse zeigte, dass die Expression der *PPDK* in *cue1-1* Blattrosetten gegenüber pOCA verringert war. Auch in den induzierten Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien war die *PPDK* gegenüber der Kontrolle stark herunterreguliert ($\log_2 = -2,66$). Mittels RT-PCR-Analyse konnte bereits ein schwächeres Signal für *PPDK* in Blättern der Mutante im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden, jedoch war der Unterschied hier nicht signifikant. Entgegen diesen Beobachtungen konnten in *cue1-6* höhere PPDK-Aktivitäten gegenüber Kontrolllinien gemessen werden (Voll et al., 2003). Möglicherweise handelt es sich um eine posttranslationale Regulation als Antwort auf den erhöhten PEP-Bedarf. Jedoch hatte das zusätzliche Ausschalten der AtPPDK keine dramatischen Beeinträchtigungen im Wachstum der *ppdk* x *cue1-1* Doppelmutanten zur Folge. Dies lässt vermuten, dass die AtPPDK bei der stromagebundenen Bereitstellung von PEP keine große Bedeutung hat.

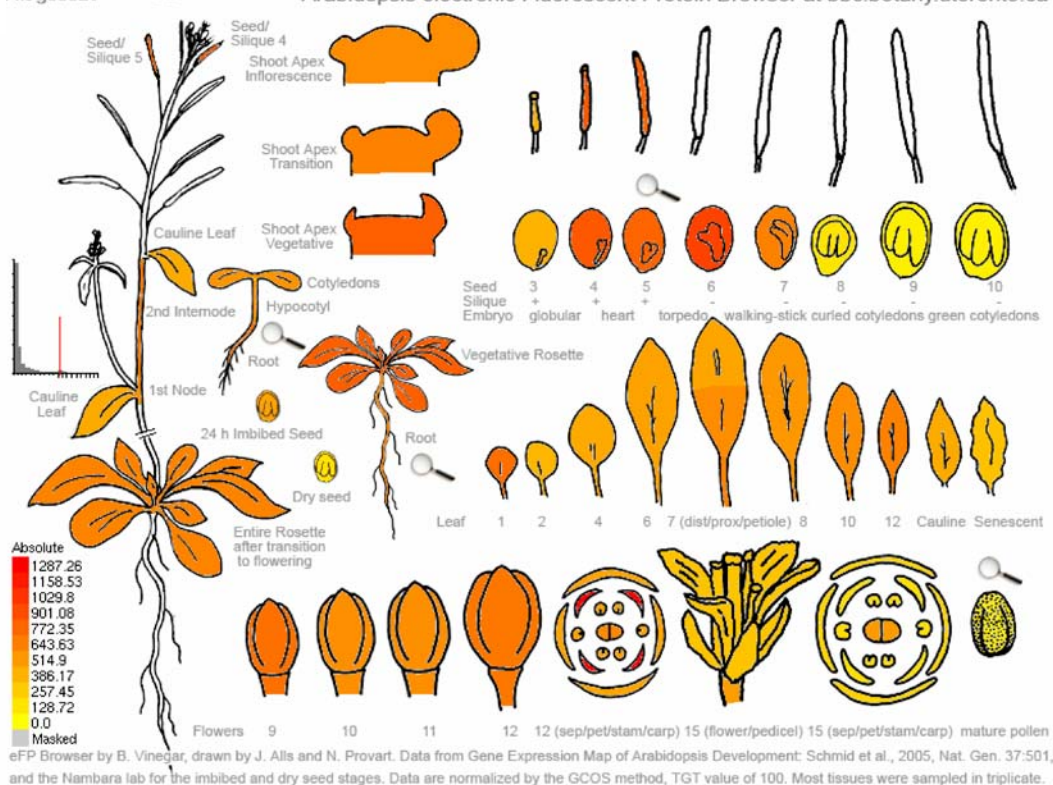
4.2.2 Die Auswirkungen des Fehlens einer potentiell plastidären Enolase auf die Entwicklung der *cue1*-Mutanten

Aufgrund unzureichender Aktivitäten der plastidären Enolase- und/oder Phosphoglyceratmutase wurde bisher vermutet, dass Chloroplasten keine vollständige Glykolyse betreiben können (Stitt und ap Rees, 1979; Journet und Douce, 1985; Van der Straeten et al., 1991; Borchert et al., 1993). Innerhalb der Familie der Phosphoglyceratmutasen (PGyM), die für die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat (3-PGA) zu 2-Phosphoglycerat (2-PGA) zuständig sind, kodieren einige Gene für potentiell plastidäre Proteine. Die nachfolgende Generierung von PEP aus 2-PGA wird durch die

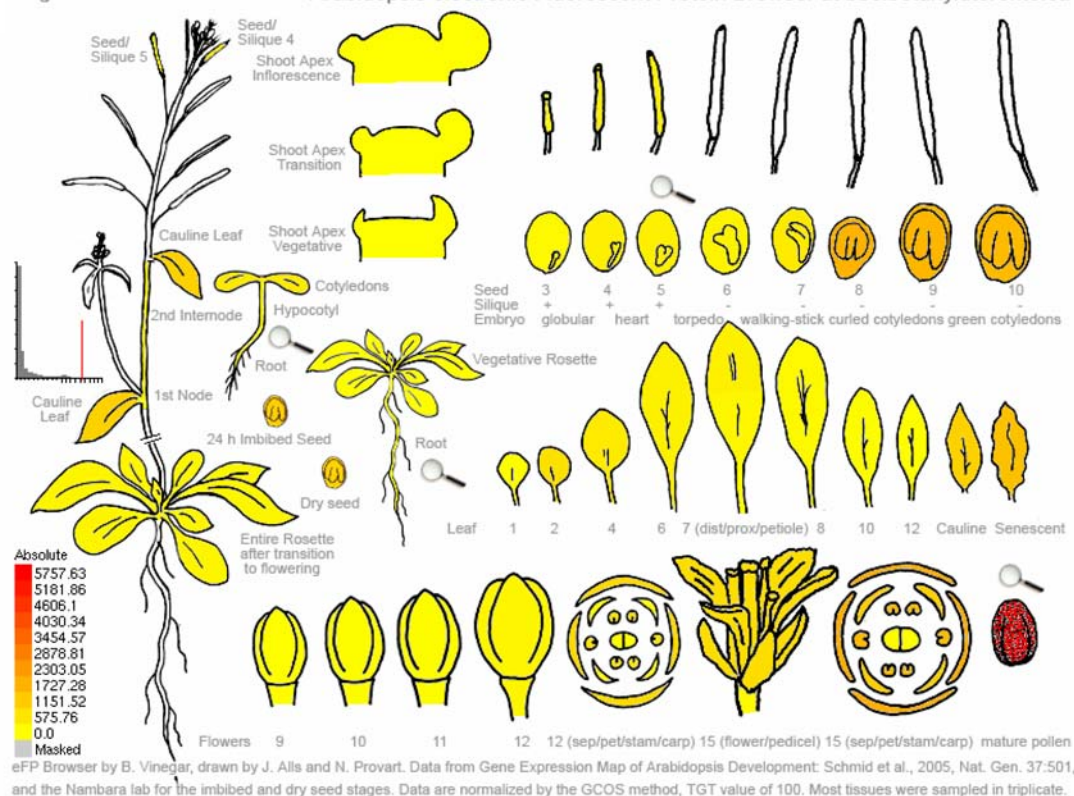
Enolase katalysiert. Bei einer der drei Enolasen handelt es sich um ein vermutlich plastidäres Protein. Daher wurde die Bedeutung einer funktionellen plastidären Glykolyse zur stromagebundenen Bereitstellung von PEP am Beispiel der Enolase untersucht. Anhand der homozygoten *p-enolase*-T-DNA-Mutante konnten keine phänotypischen Abweichungen zum Wildtyp beobachtet werden (s. 3.12.3). Somit scheint der Ausfall der potentiell plastidären Enolase zumindest keinen sichtbaren Effekt auf die Entwicklung der Pflanze zu haben. Es wurde festgestellt, dass die Aktivität der Enolase in der *knock-out* Mutante um 20% in den Blattrosetten und um 45% in der Wurzel gegenüber dem Wildtyp vermindert war (3.12.4). Unter der Berücksichtigung, dass die potentiell plastidäre Enolase hauptsächlich in der Wurzel exprimiert ist, könnte der hohe Aktivitätsverlust in der Wurzel darauf hindeuten, dass es sich um eine plastidäre Enolase handelt. Jedoch wäre es sinnvoll, die Lokalisation des Proteins infolge weiterer Untersuchungen, z. B. mittels GFP-Fusionen, zu überprüfen. Interessanterweise wurden in den *cue1-1* Mutanten insgesamt höhere Enolase-Aktivitäten gegenüber den Kontrollen gemessen. Hier war die Aktivität um 70% in Blattrosetten und um 25% in Wurzeln gegenüber pOCA erhöht. Während in *cue1-6* Blattrosetten stark erhöhte Aktivitäten detektiert wurden, war die Enolase-Aktivität in der Wurzel um 50% gegenüber Col-0 reduziert. Aufgrund der starken Differenzen in den Enzymaktivitäten zwischen den *cue1-1* und *cue1-6* Allelen, wären weitere Messungen zur Überprüfung der Ergebnisse lohnenswert. Es stellt sich die Frage, ob die gesteigerte Aktivität der Enolase in den Blättern und z. T. auch in den Wurzeln der *cue1*-Mutanten auf eine erhöhte Aktivität der potentiell plastidären Enolase beruht, die möglicherweise als Antwort auf die Limitationen in der Bereitstellung an PEP im Stroma hochreguliert wurde. Infolge der genomweiten Expressionsanalyse der *cue1*-Mutanten konnte keine Deregulierung der potentiell plastidären Enolase oder der cytosolischen Enolasen in *cue1-1* gegenüber pOCA beobachtet werden (s. 3.10.1). Beim Vergleich der Expressionssignale von *PPT1* (s. Abb. 4.3 A) und der vermutlich plastidären *Enolase* (s. Abb. 4.3 C) in den verschiedenen Geweben und Entwicklungsphasen, wird deutlich, dass sich die Expressionsmuster teilweise überlappen, obwohl für *PPT1* insgesamt stärkere Expressionssignale detektiert wurden. Die potentiell plastidäre Enolase ist hauptsächlich in der Wurzel exprimiert. Mittels RT-PCR konnte in diesem Gewebe auch ein deutlich stärkeres Signal detektiert werden (s. 3.12.1). Für beide Gene wurden höhere Signalintensitäten in den frühen Phasen der Entwicklung vegetativer und reproduktiver Gewebe festgestellt (s. Abb. 4.3 A, C). Vor allem in der Phase der Embryoentwicklung zeigen *PPT1* und *Enolase* ein korrelierendes Expressionsmuster. Dies unterstützt die

Vermutung, dass die unzureichende Versorgung des Plastidenstromas mit PEP in *cue1* zumindest teilweise durch die plastidäre Enolase kompensiert werden könnte. Interessanterweise hatte der *knock-out* der putativ plastidären Enolase, zusätzlich zum Ausfall des PPT1, dramatische Auswirkungen auf die Entwicklung der Pflanze. Es war nicht möglich, hinsichtlich der Enolase homozygote *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten zu generieren. Bereits der Anteil heterozygoter Doppelmutanten innerhalb der F₂-Generation war sehr gering. Von den Linien, die hinsichtlich der *PPT1*-Mutation homozygot waren, lag die Enolase statt der erwarteten 50% in nur 8% dieser Linien im heterozygoten Zustand vor. Diese Pflanzen zeigten gegenüber *cue1-1* ein stark retardiertes Wachstum (s. 3.12.3). Zudem waren die Schoten unterentwickelt und die Anzahl der Samen um 50% verringert. Obwohl berücksichtigt werden muss, dass in der *p-enolase*-Mutante mehrere Insertionen vorlagen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung der Doppelmutanten hatten, scheint die Letalität der homozygoten Doppelmutanten in den gemeinsamen Ausfall der PPT1- und Enolase-Funktion begründet zu sein. Da eine Keimungsletalität ausgeschlossen werden kann, sind die homozygoten Doppelmutanten möglicherweise in einer frühen embryonalen Entwicklungsphase gestört. Weitere Studien wie ein „*Artificial MicroRNA*“-induziertes *Silencing* (Schwab et al., 2006) für Enolase im *cue1*-Hintergrund, könnten Hinweise liefern, welche primären Veränderungen durch die funktionelle Einschränkung der potentiell plastidären Enolase im Stoffwechsel der Mutanten ausgelöst werden. Die Ergebnisse lassen bisher vermuten, dass die plastidäre Enolase eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stoffwechselflüsse in Plastiden durch die Anlieferung von PEP spielen könnte. Vor allem in der Wurzel würde ihr eine große Bedeutung zukommen, da der *PPT2* in diesem Gewebe nicht exprimiert ist, aber trotzdem Derivate aus dem Phenylpropanstoffwechsel wie Flavonoide in der *cue1*-Mutante akkumuliert werden können (s. 3.13).

(A) At5g33320 264419_s_at CUE1 Arabidopsis electronic Fluorescent Protein Browser at bbc.botany.utoronto.ca



(B) At4g15530 245528_at Arabidopsis electronic Fluorescent Protein Browser at bbc.botany.utoronto.ca



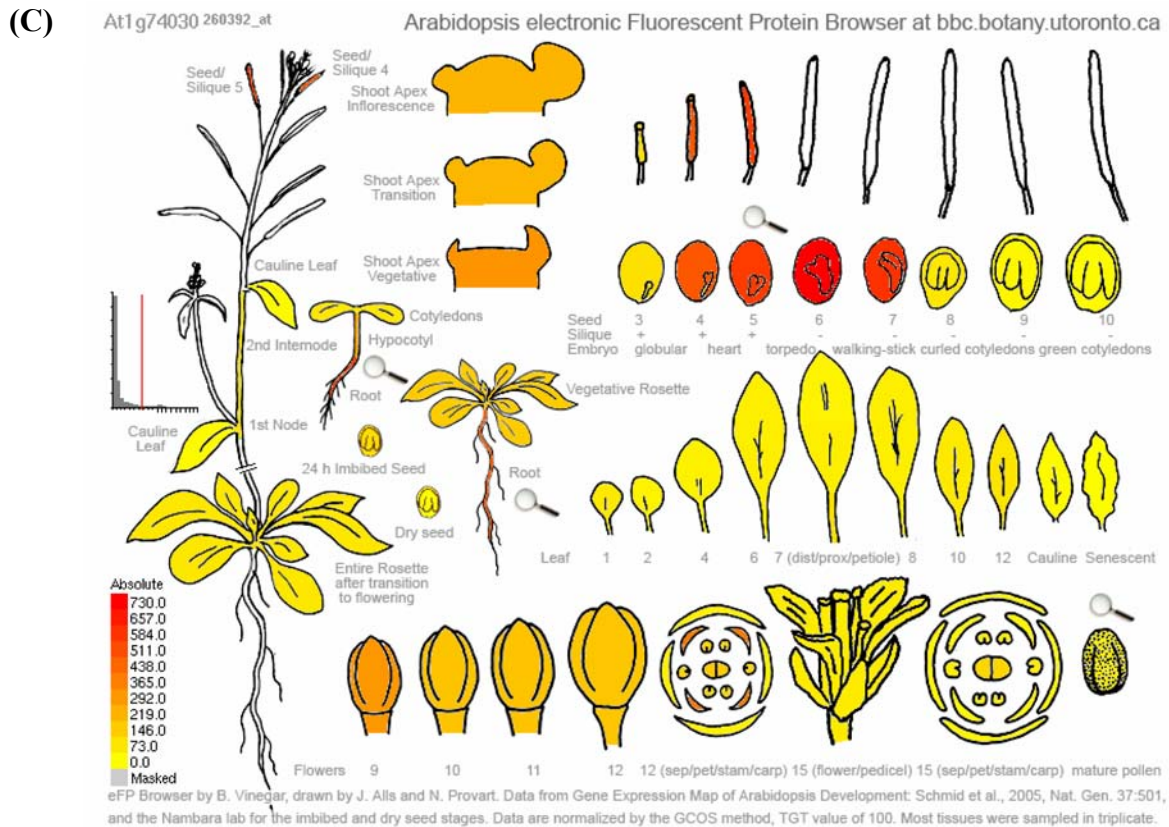


Abb. 4.3: Die Expression des *AtPPT1* (A), der *AtPPDK* (B) und der putativ plastidären *Enolase* (C) in den verschiedenen Geweben während der Pflanzenentwicklung. Die verwendeten Daten sind im Internet unter der folgenden Adresse erhältlich: <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efp.Web.cgi>

4.3 Die Ausprägung eines *cue1*-ähnlichen retikulierten Blattphänotyps am Beispiel der *A. thaliana* Mutanten *reticulata* und *dov1*

Die Ausbildung eines retikulierten Phänotyps ist einer der pleiotropen Effekte in der *cue1*-Mutante. Es gibt einige Mutanten in *A. thaliana*, die einen ähnlich aberranten Blattphänotyp mit dunkelgrünem Leitgewebe und hellen Interkostalfeldern ausprägen. Die auch als *reticulata* bekannte Mutante *lcd1-1* weist keine pleiotropen Effekte auf (Rédei und Hirono, 1964; Barth und Conklin, 2003; González-Bayón et al., 2006). Für das *LCD1*-Gen, welches in der Mutante defekt ist, wurde eine Funktion in der post-embryonalen Blattentwicklung vorgeschlagen (Barth und Conklin, 2003). Die Mutation in diesem Gen resultierte in einer geringeren Zelldichte im Palisadenparenchym (*lcd* = lower cell density). Auch in *cue1* ist der Anteil des Palisadenparenchyms im Blatt gegenüber Kontrollpflanzen verringert, was auf die Vergrößerung des Interzellularraumes zurückzuführen ist (Streatfield et al., 1999). Im Gegensatz zu *cue1* ist die Plastidenentwicklung im Mesophyll

von *lcd1-1* nicht gestört. Anhand der *lcd1-knock-out*-Mutante wird deutlich, dass sich der Defekt in LCD1 nur in einem etwas helleren Interkostalbereich ausprägt und nicht wie bei *cue1* die gesamte Blattmorphologie verändert ist (s. 3.14.2). Weiterhin weist *lcd1* kein retardiertes Wachstum auf. LCD1 ist ubiquitär, hauptsächlich aber in der frühen Phase der Blattentwicklung, vor allem im Leitbündelbereich, und in den Wurzelspitzen exprimiert und korreliert mit der Expression von *PPT1*. Studien von González-Bayón et al. (2006) an *reticulata (re-3) x cue1-5* Doppelmutanten weisen daraufhin, dass *cue1-5* epistatisch zu *re-3* ist. Daher wurde vorgeschlagen, dass *Reticulata* und *PPT1* in einem gemeinsamen, die Blattentwicklung steuernden Reaktionsweg fungieren. Die Beobachtung, dass LCD1 (At2g37860) in *cue1-1* Blattrosetten gegenüber dem Wildtyp leicht hochreguliert war, könnte auf eine gemeinsame Regulation der Gene hinweisen.

In silico Analysen wiesen auf ein putatives plastidäres Transitpeptid in *Reticulata* hin, so dass eine funktionelle Bedeutung in Plastiden nicht ausgeschlossen werden kann, auch wenn *Reticulata* für die Biogenese der Plastiden nicht essentiell ist.

In der *A. thaliana dov1*-Mutante (Kinsman und Pyke, 1998), die einen *cue1*-ähnlichen retikulierten Blattphänotyp ausprägt, konnte im Gegensatz zu *reticulata* eine Störung der Chloroplastenentwicklung beobachtet werden, die wie in der *cue1*-Mutante auf die Zellen des Mesophylls beschränkt ist. Obwohl die Größe der Chloroplasten in *dov1* nicht beeinträchtigt ist, erscheint die innere plastidäre Struktur abnorm. Zudem ist die Anzahl der Chloroplasten um mehr als 50% gegenüber denen im Wildtyp reduziert. Bisher ist nicht bekannt, welches Gen in der *dov1*-Mutante defekt ist, daher lässt sich ein möglicher Zusammenhang zu AtPPT1 und nachgeschalteten Stoffwechselwegen nur schwer herstellen.

4.4 Die Rolle von NO als Signalmolekül in der *cue1*-Mutante

In Studien von He et al. (2004) wurde festgestellt, dass die *Atnox1*-Mutante nicht nur einen retikulierten Blattphänotyp ausprägt, sondern auch eine Deletion des AtPPT1 aufweist, so dass die Mutante allelisch zu *cue1* ist. *Atnox1* wurde bei der Durchmusterung von NO überproduzierenden Mutanten identifiziert. NO fungiert als Signalmolekül in vielen Bereichen des pflanzlichen Stoffwechsels wie Keimung, Photomorphogenese, Wurzelwachstum, Programmierter Zelltod, Seneszenz sowie Pathogen-Abwehr und hormonelle Steuerung der Pflanzenentwicklung (Neill et al., 2002; García-Mata und

Lamattina, 2002; Guo et al., 2003; Lamattina et al., 2003; Zeier et al., 2004; Wendehenne et al., 2004; Lamotte et al., 2005). Im Vergleich zum Wildtyp wurden sowohl für *Atnox1* als auch für *cue1-5* höhere NO-Gehalte gemessen (He et al., 2004). Obwohl zumindest für *Atnox1* eine erhöhte NO-Produktion in Wurzeln postuliert wurde, konnten mittels fluoreszenzmikroskopischem NO-Nachweis am Beispiel der *cue1-6* Mutante keine Unterschiede im NO-Gehalt zum Wildtyp festgestellt werden (s. 3.14.1). Weiterhin wurde infolge der genomweiten Expressionsanalyse eine erhöhte Expression der NO-Synthase (NOS) in den *cue1-1* Blattrosetten, nicht aber in den Wurzeln der *cue1-1* Mutante beobachtet. Auch in den EtOH-induzierten Col-0/*alcA:PPTIRNAi* Linien war die *AtNOS* hochreguliert. Die in *cue1-5* und *Atnox1* gezeigte Hypersensitivität auf SNP, ein NO-Donor, (He et al., 2004), konnte für *cue1-6* bestätigt werden. Bei der NOS katalysierten Synthese von NO wird Arginin zu Citrullin umgesetzt. Da teilweise höhere Gehalte an freiem Arginin und Citrullin in der *cue1*-Mutante gemessen werden konnten (Streatfield et al., 1999; He et al., 2004), wurde postuliert, dass eine in *cue1* erhöhte Produktion von Arg die Umsetzung zu NO fördert. Jedoch wurden in Studien von Voll et al. (2003) nicht in allen *cue1*-Allelen höhere Gehalte an Arg und Cit detektiert, in *cue1-6* waren sie sogar verringert. NO kann jedoch auch über die Nitratreduktase (NR) aus Nitrit generiert werden (Yamasaki et al., 1999; Rockel et al., 2002; Kaiser et al., 2002). Bisher ist nicht vollständig geklärt, welcher Syntheseweg zur Bereitstellung von NO in der Pflanze bevorzugt wird. Der durch NR katalysierten NO-Produktion kommt z. B. eine Bedeutung bei dem ABA-induzierten Stomata-Verschluss in *A. thaliana* zu (Desikan et al., 2002). Für NO wurde auch eine Funktion in der Blühinduktion vorgeschlagen, die sowohl in *nox1* als auch in *cue1* verzögert ist (He et al., 2004). Die *Atnox1*-Mutante, die durch den Defekt in der NO-Synthase verringerte NO-Gehalte aufweist, blüht früher als der Wildtyp. Zudem war die Expression einiger in die Blühinduktion eingebundenen Gene in *Atnox1* und *Atnox1* gegenläufig reguliert. Ein Steuerelement der photoperiodischen Regulierung der Blühinduktion, *CONSTANS (CO)* (Suarez-Lopez et al., 2001; Yanovsky und Kay, 2002), war in *Atnox1* und *cue1-5* im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimiert. Mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse für *cue1-1* wurde für das entsprechende Gen (At5g15840) keine veränderte Expression festgestellt. Jedoch konnten einige deregulierten Gene, von denen ein großer Teil in der Expression herabgesetzt war, als CO-ähnliche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die Expression eines der in *cue1-1* Blättern und Wurzeln herunterregulierten CO-ähnlichen Transkriptionsfaktoren war auch nach Cytokinin-Behandlung stark herabgesetzt (Brenner et al., 2005). Eine Interaktion von NO

mit Cytokinin ist zu vermuten, zumal für NO auch Funktionen innerhalb ABA-, Ethylen- und Auxin-induzierter Stoffwechselprozesse nachgewiesen wurden (Desikan et al., 2002; Correa-Aragunde et al., 2004; Mishina et al., 2007). Es konnte beobachtet werden, dass die NO-Synthese durch Cytokinine induziert wird (Scherer und Holk, 2000; Scherer, 2004). Die Expression von *AtNOS* war in Cytokinin-defizienten Pflanzen stark herunterreguliert (Brenner et al., 2005). Somit könnte die erhöhte *AtNOS*-Expression in *cuel* durch die verstärkte Akkumulation von Cytokinin in der Mutante erklärt werden (s. 3.7).

NO stellt möglicherweise auch eine Signalkomponente innerhalb der Ligninbiosynthese dar (Ros Barceló et al., 2002). In Studien von Gabaldón et al. (2005) an *Zinnia elegans* wurde die Rolle von NO während der Xylemdifferenzierung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Gehalt an NO während der Lignifizierung erhöht, in bereits lignifizierten Geweben aber verringert war, d. h. NO-Produktion und Lignifizierung in einem inversen Verhältnis zueinander stehen. Somit könnte der hohe Gehalt an NO in *cuel* auch durch Limitationen in der Lignifizierung erklärt werden. Letzteres wäre in *cuel* zu erwarten, da Ligninmonomere über den Phenylpropanweg gebildet werden (Lewis und Yamamoto, 1990). Neben der Bedeutung für die Ligninbiosynthese, ist NO in der Pathogen-Abwehr eingebunden und kann die Expression beteiligter Schlüsselenzyme aus dem Phenylpropanstoffwechsel wie PAL und CHS induzieren (Zeier et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass NO eine generelle Funktion als Signalmolekül im Phenylpropanstoffwechsel übernehmen könnte.

Die Ergebnisse weisen auf eine Verbindung zwischen den NO-Gehalten in der *cuel*-Mutante und der Ausbildung des retikulierten Phänotyps hin. Vor allem im Hinblick auf die Funktion als Signalmolekül im Stoffwechsel von Phytohormonen wie Cytokinin, sollte für NO eine Rolle innerhalb der in *cuel* gestörten Reaktionskette in Betracht gezogen werden.

4.5 Die mögliche Funktion von PPT1 in der Wurzel

Mittels zellspezifischer Expressionsanalysen für *AtPPT1* und *AtPPT2* wurde festgestellt, dass *PPT1* eine starke Expression in den Wurzelspitzen zeigt, während *PPT2* in diesem Gewebe nicht aktiv ist (Knappe et al., 2003). Da die Wurzelspitze einer der Synthesorte von Flavonoiden in Keimlingen ist (Peer et al., 2004), wäre eine starke Limitation im Gehalt dieser PPT1 nachgeschalteten Stoffwechselprodukte in den Wurzeln der *cuel*-Mutante zu erwarten. Mittels HPTLC-Analyse wurde beobachtet, dass Wurzeln ein von

Blattrosetten abweichendes Spektrum von Flavonol- bzw. Sinapoyl-Derivaten aufweisen. Vor allem für zwei Sinapoyl-Derivate konnten in Wurzeln stärkere Fluoreszenzsignale detektiert werden (s. 3.13.2). Jedoch wurden kaum Unterschiede im Gehalt an Sinapoyl-Derivaten wie im generellen Gehalt an fluoreszenzmikroskopisch detektierten Flavonol-Derivaten zwischen *cuel* und dem Wildtyp festgestellt (s. 3.13.1). Demnach muss davon ausgegangen werden, dass neben den PPTs andere Stoffwechselwege zur Bereitstellung von PEP im Plastidenstroma existieren. Die Synthese von PEP durch die plastidäre PPDK scheint dabei keine große Rolle zu spielen (s. 4.2.1). In den Wurzeln der *ppdk x cuel-1* Doppelmutanten wurde eine Akkumulation von Flavonoiden nachgewiesen. Zwischen allen untersuchten *cuel*, *ppdk* sowie *ppdk x cuel-1* Doppelmutanten, waren kaum Abweichungen in der Stärke der DPBA-induzierten sekundären Fluoreszenzsignale gegenüber den Wildtypkontrollen zu erkennen. Wie bereits erwähnt (s. 4.2.2), könnte einer funktionellen plastidären Glykolyse eine Bedeutung bei der stromagebundenen Synthese von PEP zugeschrieben werden. Die potentiell plastidäre Enolase ist hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert. Zudem waren die homozygoten *p-enolase x cuel-1* Doppelmutanten letal. Die Bestimmung des Flavonoidgehaltes in den heterozygoten *p-enolase x cuel-1* Doppelmutanten steht jedoch noch aus. Zwei der vermutlich plastidären Phosphoglyceratmutasen (At1g78050, At1g22170) zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie die potentiell plastidäre Enolase (Internet: bbc.botany.utoronto.ca). Dies deutet auf eine gemeinsame Aktivität der beiden Enzyme in den Plastiden hin. Somit wäre eine funktionelle Glykolyse in diesem Gewebe möglich und in den Wurzeln der *cuel*-Mutante möglicherweise essentiell.

Es besteht die Möglichkeit, dass PPT1 weitere Funktionen in der Wurzel übernimmt, wie z. B. die Bereitstellung von Pyruvat über PEP als Vorstufe für den MEP-Stoffwechselweg. Für vier der neun Isopentenyl-Transferasen (IPTs) in *A. thaliana* wird eine plastidäre Lokalisation vermutet (Kasahara et al., 2004). *AtIPT8* ist in Samen und *AtIPT1*, *AtIPT3* sowie *AtIPT5* in der Wurzel exprimiert (Werner et al., 2006). Möglicherweise wird in diesen Geweben die Isoprenylseitenkette für die Cytokininbiosynthese hergestellt. Weiterhin könnte eine in Plastiden z. T. autonome Regulation der Cytokininantwort erfolgen (Brenner et al., 2005), die hinsichtlich der in *cuel* gestörten Cytokinin Signalkette von Bedeutung sein könnte.

5. Zusammenfassung

Die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat (PEP) im Stroma von Plastiden ist essentiell für verschiedene Stoffwechselvorgänge wie den Shikimatweg, der zur Synthese von aromatischen Aminosäuren führt. Diese werden als Vorstufen für den Phenylpropanstoffwechsel und für die Synthese weiterer Sekundärmetabolite benötigt. PEP wird aus dem Cytosol über einen PEP/Phosphat-Translokator (PPT) in das Plastidenstroma importiert. *Arabidopsis* besitzt zwei funktionelle PPTs (AtPPT1 und AtPPT2). Die *Arabidopsis thaliana cue1*-Mutante weist einen Defekt im AtPPT1 auf und zeigt einen retikulierten Blattphänotyp sowie deutlich verkürzte Wurzeln. Der Blattphänotyp beruht auf einer Entwicklungsstörung des Mesophylls und deren Chloroplasten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Limitation in der Bereitstellung an PEP und den Beeinträchtigungen in der Entwicklung der *cue1*-Mutante untersucht. Durch transiente Fütterung der *cue1*-Mutanten mit Dehydrodiconiferylalkohol-Glukosid (DCG) oder trans-Zeatin, wurde der retikulierte Blattphänotyp revertiert. Mit Hilfe eines Ethanol-induzierbaren RNAi-Ansatzes für *AtPPT1* im Col-0 Hintergrund, konnten Transformanten generiert werden, die einen retikulierten Phänotyp ausprägten. Die De-Repression des *PPT1* nach Ethanol-Entzug führte in den Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien wiederum zu einer Rückentwicklung des Phänotyps.

Mittels genomweiter Expressionsanalyse von *cue1-1* Rosettenblättern und Wurzeln gegenüber Wildtyp sowie in einer Zeitreihe nach DCG-Fütterung und nach De-Induktion der Col-0/*alcA:PPT1*RNAi Linien, konnten „Kandidatengene“ identifiziert werden, die möglicherweise in die Entwicklungsprozesse eingebunden sind, die in der *cue1*-Mutante gestört sind. Die Expressionsdaten weisen auf eine Verbindung zwischen den Limitationen in *cue1* und Störungen innerhalb des Stoffwechsels von Phytohormonen wie Cytokinin und Auxinen hin. Die *cue1*-Mutanten weisen im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Gehalte an Cytokinin auf. Eine Gegenüberstellung der in *cue1* deregulierten Gene mit den Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten und Cytokinin-behandelten Pflanzen lässt aber vermuten, dass *cue1* Cytokinin-insensitiv ist. Möglicherweise ist die Steuerung der Cytokinin-Antwort in der *cue1*-Mutante gestört, die sich in pleiotrope Beeinträchtigungen der Pflanzenentwicklung äußert.

Nach „Activation tagging“, bei dem die *cue1*-Mutanten mit einem Vektor transformiert wurden, dessen T-DNA mit einer 4 x 35S *Enhancer* Sequenz ausgestattet war, konnte eine

Revertante isoliert werden, die eine Nicotianaminsynthase überexprimiert. Das Genprodukt Nicotianamin ist in den Transport von Eisen eingebunden. Ein Symptom von Eisenmangel ist die Ausprägung eines chlorotischen Blattphänotyps ähnlich dem der *cue1*-Mutante.

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, wie sich die Blockade weiterer möglicher Reaktionswege, PEP im Plastidenstroma zu generieren, auf die Pflanzenentwicklung auswirkt. Dabei wurde die Rolle der Pyruvat, P_a -Dikinase (PPDK) und einer vollständigen plastidären Glykolyse am Beispiel einer putativ plastidären Enolase überprüft. Es wurden T-DNA-Mutanten am *AtPPDK*- und *AtEnolase*-Lokus isoliert und mit der *cue1*-Mutante gekreuzt. Die *ppdk*- und *p-enolase*-Mutanten zeigten keine phänotypischen Abweichungen gegenüber dem Wildtyp. Dagegen prägte die *ppdk* x *cue1-1* Doppelmutante z. T. längere Wurzeln aus. Die hinsichtlich der Enolase heterozygoten *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten waren im Wachstum stark retardiert und zeigten unterentwickelte Schoten. Homozygote *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten konnten nicht generiert werden. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass eine vollständige plastidäre Glykolyse bei der Bereitstellung von PEP für den Shikimatweg in bestimmten Geweben oder Stadien der Pflanzenentwicklung von Bedeutung sein könnte. In den Wurzeln der *cue1*-Mutanten konnten keine generellen Unterschiede in der Akkumulation von Flavonoiden, die sich aus dem Shikimatweg ableiten, gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Vor dem Hintergrund, dass weder AtPPT2 noch AtPPDK in Wurzeln exprimiert ist, könnte eine funktionelle Glykolyse, bzw. ausreichende plastidäre Enolase- und Phosphoglyceratmutase-Aktivitäten, die Bereitstellung von PEP in der Wurzel ermöglichen.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
<i>AHK</i>	<i>Arabidopsis histidine kinase</i>
<i>AHP</i>	<i>Arabidopsis histidine phosphotransfer protein</i>
<i>Am</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
<i>ARR</i>	<i>Arabidopsis response regulator</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Benzyladenin
bar	Basta®-Resistenz
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-Indoylphosphat
Be-0	Bensheim
BoPPT	Blumenkohl Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CA	Coniferylalkohol
<i>CAB</i>	<i>chlorophyll a/b binding protein</i>
CAD	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase
CaMV	<i>cauliflower mosaic virus</i> (= Blumenkohl-Mosaikvirus)
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
cDNA	<i>copy</i> DNA
C4H	Cinnamat-4-Hydroxylase

CHS	Chalkonsynthase
Cit	Citrullin
CKX	Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase
4CL	4-Coumaroyl-CoA-Ligase
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO	<i>Constans</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
Col-0	Colombia
CRE1	<i>Cytokinin response 1</i>
cue	<i>chlorophyll a/b binding protein underexpressed</i>
DAF-2 DA	4,5-diaminofluoreszin Diacetat
DAHP	3-desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
DCA	Dehydrodiconiferylalkohol
DCG	Dehydrodiconiferylalkoholglukosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dov	<i>differential development of vascular associated cells</i>
DPBA	Diphenylborat-2-aminoethylester
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Ø	Durchmesser
ΔE	Extinktionsänderung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em.	Emission
EMS	Ethylmethylsulfonsäure
EPSP	5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat
EPSPS	EPSP-Synthase

ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>ERE</i>	<i>ethylene-responsive element</i>
Ery4P	Erythrose-4-Phosphat
et al.	und Andere
EtOH	Ethanol
Ex.	Extinktion
μF	Mikrofarad
Fa.	Firma
Fe	Eisen
Frk6P	Fruktose-6-Phosphat
<i>Ft</i>	<i>Flaveria trinervia</i>
FW	Frischgewicht
g	Gramm
G	Guanin
γ	Gamma
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glk1P	Glukose-1-Phosphat
Glk6P	Glukose-6-Phosphat
L-Gln	L-Glutamin
L-Glu	L-Glutaminsäure
GPT	Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	Wasser, doppelt destilliert
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
IAA	Indolessigsäure
IAN	Indol-3-Acetonitril
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim

IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPT	Isopentenyltransferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
α KG	α -Ketoglutarat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	<i>left border</i> (linke T-DNA-Begrenzungssequenz)
<i>lcd</i>	<i>lower cell density</i>
LiAc	Lithiumacetat
log	logarithmischer Wert
m	Meter
mA	Milliampère
MeOH	Methanol
MEP	Methylethritol-Phosphat
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ mol	Mikromol
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Murashige & Skoog Pflanzenmedium
mU	Milli-Units
MVA	Mevalonat

Na	Natrium
NA	Nicotianamin
NAA	Naphthylelessigsäure
NAAT	Nicotianamin-Aminotransferase
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NAS	Nicotianaminsynthase
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
Ni ²⁺ NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NIT	Nitrilase
NH ₄ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>nox</i>	<i>nitric oxide overexpressed</i>
NPA	1-Naphthylphthalaminsäure
NR	Nitratreduktase
OAA	Oxalacetat
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
OPPP	Oxidativer Pentosephosphat-Zyklus
%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Masseprozent
P _a	anorganisches Phosphat
³² P	Phosphor-Isotop
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	PEP-Carboxykinase
2-PGA	2-Phosphoglycerat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
PGyM	Phosphoglyceratmutase
Phe	Phenylalanin
PIN	<i>pin-formed</i>
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _a	Pyrophosphat
PPDK	Pyruvat,P _a -Dikinase
PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PSII	Photosystem II
PT	Phosphat-Translokator
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	<i>right border</i> (rechte T-DNA-Begrenzungssequenz)
<i>re</i>	<i>reticulata</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>interference</i> RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
s.	siehe
35S	CaMV35S-Promotor
<i>SAG</i>	<i>senescence-associated gene</i>
<i>SAP</i>	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylphosphat

SNP	Natriumnitroprussid
SD	Standardabweichung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCP	<i>teosinte-branched, cycloidea PCNA</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
TK	Transketolase
tnos	nos-Terminator
T6P	Trehalose-6-Phosphat
TPH	Trehalose-6-Phosphat-Hydrolase
TPP	Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase
TPS	Trehalose-6-Phosphat-Synthase
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) ₁₀
Trp	Tryptophan
<i>tt4</i>	<i>transparent testa 4</i>
Tyr	Tyrosin
U	Units
u. a.	unter anderem
Ura	Uracil
UV	ultraviolett
X-GAL	5- Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
xg	Erdbeschleunigung
XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator
<i>YSL</i>	<i>yellow-stripe-like</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7. Literaturverzeichnis

- Adam, K.P., Thiel, R., and Zapp, J.** (1999). Incorporation of 1-[1-(13)C]Deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Arch Biochem Biophys* **369**, 127-132.
- Ahmad, M., and Cashmore, A.R.** (1993). Hy4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Encodes a Protein with Characteristics of a Blue-Light Photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Anderson, K.S., Sammons, R.D., Leo, G.C., Sikorski, J.A., Benesi, A.J., and Johnson, K.A.** (1990). Observation by C-13 Nmr of the Epsp Synthase Tetrahedral Intermediate Bound to the Enzyme Active-Site. *Biochemistry-US* **29**, 1460-1465.
- Anderson, S.L., and Kay, S.A.** (1995). Functional dissection of circadian clock- and phytochrome-regulated transcription of the *Arabidopsis* CAB2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1500-1504.
- Appert, C., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J., and Amrhein, N.** (1994). Structural and Catalytic Properties of the 4 Phenylalanine Ammonia-Lyase Isoenzymes from Parsley (*Petroselinum-Crispum* Nym). *Eur J Biochem* **225**, 491-499.
- Arguello-Astorga, G., and Herrera-Estrella, L.** (1998). Evolution of light-regulated plant promoters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 525-555.
- Attoumbre, J., Charlet, S., Baltora-Rosset, S., Hano, C., Grandic, S.R.L., Gillet, F., Bensaddek, L., Mesnard, F., and Fliniaux, M.A.** (2006). High accumulation of dehydrodiconiferyl alcohol-4-beta-D-glucoside in free and immobilized *Linum usitatissimum* cell cultures. *Plant Cell Rep* **25**, 859-864.
- Auer, C.A.** (1997). Cytokinin metabolism in the *Arabidopsis* mutant *cym*. *Plant Physiol.* **114**, 792-792.
- Bagge, P., and Larsson, C.** (1986). Biosynthesis of Aromatic-Amino-Acids by Highly Purified Spinach-Chloroplasts - Compartmentation and Regulation of the Reactions. *Physiol Plantarum* **68**, 641-647.
- Bahrami, A.R., Chen, Z.H., Walker, R.P., Leegood, R.C., and Gray, J.E.** (2001). Ripening-related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol Biol* **47**, 499-506.
- Bao, W., Omalley, D.M., Whetten, R., and Sederoff, R.R.** (1993). A Laccase Associated with Lignification in Loblolly-Pine Xylem. *Science* **260**, 672-674.

- Barnes, S.A., Nishizawa, N.K., Quaggio, R.B., Whitelam, G.C., and Chua, N.H.** (1996). Far-red light blocks greening of arabidopsis seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* **8**, 601-615.
- Bartel, B., and Fink, G.R.** (1994). Differential Regulation of an Auxin-Producing Nitrilase Gene Family in Arabidopsis-Thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6649-6653.
- Barth, C., and Conklin, P.L.** (2003). The lower cell density of leaf parenchyma in the Arabidopsis thaliana mutant lcd1-1 is associated with increased sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae*. *Plant J* **35**, 206-218.
- Bartholomew, D.M., Bartley, G.E., and Scolnik, P.A.** (1991). Absciscic-Acid Control of Rbcs and Cab Transcription in Tomato Leaves. *Plant Physiol.* **96**, 291-296.
- Bartley, G.E., and Scolnik, P.A.** (1995). Plant Carotenoids - Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Plant Cell* **7**, 1027-1038.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A., and Weiler, E.W.** (1992). Cloning and Expression of an Arabidopsis Nitrilase Which Can Convert Indole-3-Acetonitrile to the Plant Hormone, Indole-3-Acetic-Acid. *Eur J Biochem* **205**, 417-424.
- Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C., and Weiler, E.W.** (1994). Molecular Characterization of 2 Cloned Nitrilases from Arabidopsis-Thaliana - Key Enzymes in Biosynthesis of the Plant Hormone Indole-3-Acetic-Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6021-6025.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W.T., Meromi, A., Nadlerhassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J., and Elkind, Y.** (1994). Quantitative Relationship between Phenylalanine Ammonia-Lyase Levels and Phenylpropanoid Accumulation in Transgenic Tobacco Identifies a Rate-Determining Step in Natural Product Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7608-7612.
- Bauer, P., Thiel, T., Klatte, M., Bereczky, Z., Brumbarova, T., Hell, R., and Grosse, I.** (2004). Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiol.* **136**, 4169-4183.
- Beggs, C.J., and Wellmann, E.** (1985). Analysis of Light-Controlled Anthocyanin Formation in Coleoptiles of Zea-Mays-L - the Role of Uv-B, Blue, Red and Far-Red Light. *Photochem Photobiol* **41**, 481-486.

- Belser, W.L., Murphy, J.B., Delmer, D.P., and Mills, S.E.** (1971). End Product Control of Tryptophan Biosynthesis in Extracts and Intact Cells of Higher Plant *Nicotiana-Tabacum* Var Wisconsin-38. *Biochim Biophys Acta* **237**, 1-&.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G.** (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **29**, 325-332.
- Bick, J.A., and Lange, B.M.** (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* **415**, 146-154.
- Bieza, K., and Lois, R.** (2001). An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.* **126**, 1105-1115.
- Binns, A.N., Chen, R.H., Wood, H.N., and Lynn, D.G.** (1987). Cell-Division Promoting Activity of Naturally-Occurring Dehydrodiconiferyl Glucosides - Do Cell-Wall Components Control Cell-Division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 980-984.
- Binns, A.N.** (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**, 173-196.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Black, R.C., Binns, A.N., Chang, C.F., and Lynn, D.G.** (1994). Cell-Autonomous Cytokinin-Independent Growth of Tobacco Cells Transformed by *Agrobacterium-Tumefaciens* Strains Lacking the Cytokinin Biosynthesis Gene. *Plant Physiol.* **105**, 989-998.
- Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Makam, S.N., and Murphy, A.S.** (2004). Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol.* **134**, 28-31.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J.** (1987). Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bonner, C.A., and Jensen, R.A.** (1997). Recognition of specific patterns of amino acid inhibition of growth in higher plants, uncomplicated by glutamine-reversible 'general amino acid inhibition'. *Plant Sci* **130**, 133-143.

- Borchert, S., Harborth, J., Schunemann, D., Hoferichter, P., and Heldt, H.W.** (1993). Studies of the Enzymatic Capacities and Transport-Properties of Pea Root Plastids. *Plant Physiol.* **101**, 303-312.
- Bowler, C., and Chua, N.H.** (1994). Emerging Themes of Plant Signal-Transduction. *Plant Cell* **6**, 1529-1541.
- Boyle, S.A., Hemmingsen, S.M., and Dennis, D.T.** (1990). Energy Requirement for the Import of Protein into Plastids from Developing Endosperm of *Ricinus-Communis* L. *Plant Physiol.* **92**, 151-154.
- Bradford, M.M.** (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brandstatter, I., and Kieber, J.J.** (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1009-1019.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L., and Schmulling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* **44**, 314-333.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., and Muday, G.K.** (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 524-535.
- Buer, C.S., and Muday, G.K.** (2004). The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell* **16**, 1191-1205.
- Byng, G., Whitaker, R., Flick, C., and Jensen, R.A.** (1981). Enzymology of L-Tyrosine Biosynthesis in Corn (*Zea-Mays*). *Phytochemistry* **20**, 1289-1292.
- Caddick, M.X., Greenland, A.J., Jepson, I., Krause, K.P., Qu, N., Riddell, K.V., Salter, M.G., Schuch, W., Sonnewald, U., and Tomsett, A.B.** (1998). An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotechnol* **16**, 177-180.
- Campos, R., Nonogaki, H., Suslow, T., and Saltveit, M.E.** (2004). Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. *Physiol Plantarum* **121**, 429-438.

- Caporale, L.H.** (1995). Chemical Ecology - a View from the Pharmaceutical-Industry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 75-82.
- Carroll, L.J., Xu, Y., Thrall, S.H., Martin, B.M., and Dunawaymariano, D.** (1994). Substrate-Binding Domains in Pyruvate Phosphate Dikinase. *Biochemistry-Us* **33**, 1134-1142.
- Cary, A.J., Liu, W.N., and Howell, S.H.** (1995). Cytokinin Action Is Coupled to Ethylene in Its Effects on the Inhibition of Root and Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis-Thaliana* Seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., and Bennett, M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H.M., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**, 165-171.
- Changzeng, W., and Zhongjian, J.** (1997). Lignan, phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis torta*. *Phytochemistry* **45**, 159-166.
- Chappell, J.** (1995). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* **107**, 1-6.
- Chapple, C.C.S., Vogt, T., Ellis, B.E., and Somerville, C.R.** (1992). An *Arabidopsis* Mutant Defective in the General Phenylpropanoid Pathway. *Plant Cell* **4**, 1413-1424.
- Chatfield, S.P., Stirnberg, P., Forde, B.G., and Leyser, O.** (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 159-169.
- Chen, C.** (1997). Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiol Plantarum* **101**, 665-673.
- Chen, Z.H., Walker, R.P., Acheson, R.M., Tecs, L.I., Wingler, A., Lea, P.J., and Leegood, R.C.** (2000). Are isocitrate lyase and phosphoenolpyruvate carboxykinase involved in gluconeogenesis during senescence of barley leaves and cucumber cotyledons? *Plant and Cell Physiology* **41**, 960-967.
- Chory, J., and Peto, C.A.** (1990). Mutations in the *Det1* Gene Affect Cell-Type-Specific Expression of Light-Regulated Genes and Chloroplast Development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8776-8780.

- Chory, J., Altschmied, L., Cabrera, H., Li, H.-m., Susek, R.** (1993). Genetic dissection of signal transduction pathway mutants. . *Methods in Cell Biology* **49**.
- Chory, J., and Susek, R.** (1994). Light signal transduction and the control of seedling development. In *Arabidopsis* (Meyerowitz, E. and Somerville, C., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 579-614.
- Christie, P.J., Alfenito, M.R., and Walbot, V.** (1994). Impact of Low-Temperature Stress on General Phenylpropanoid and Anthocyanin Pathways - Enhancement of Transcript Abundance and Anthocyanin Pigmentation in Maize Seedlings. *Planta* **194**, 541-549.
- Christie, J.M., and Jenkins, G.I.** (1996). Distinct UV-B and UV-A blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **8**, 1555-1567.
- Chung, C.T., and Miller, R.H.** (1993). Preparation and Storage of Competent *Escherichia-Coli*-Cells. *Method Enzymol* **218**, 621-627.
- Cochrane, F.C., Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (2004). The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* **65**, 1557-1564.
- Coenen, C., and Lomax, T.L.** (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* **2**, 351-356.
- Cohen, A.S., Popovic, R.B., and Zalik, S.** (1979). Effects of Polyamines on Chlorophyll and Protein-Content, Photo-Chemical Activity, and Chloroplast Ultrastructure of Barley Leaf-Disks during Senescence. *Plant Physiol.* **64**, 717-720.
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., and Hendrickson, A.M.** (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* **8**, 197-199.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., and Lamattina, L.** (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.
- Costa, M.A., Collins, R.E., Anterola, A.M., Cochrane, F.C., Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (2003). An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry* **64**, 1097-1112.
- Cottage, A., Yang, A.P., Maunders, H., de Lacy, R.C., and Ramsay, N.A.** (2001). Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking. *Plant Mol Biol Rep* **19**, 321-327.

- Cramer, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X.W., Dildine, S.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., and Schuch, W.** (1989). Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Organization and Structure. *Plant Mol Biol* **12**, 367-383.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), 1250-1268.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E.** (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* **18**, 215-222.
- De Luca, V., and Laflamme, P.** (2001). The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 225-233.
- Deikman, J.** (1997). Elucidating cytokinin response mechanism using mutants. *Plant Growth Regul.* **23**, 33-40.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J., and Barroso, J.B.** (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Dennis, D.T., and Miernyk, J.A.** (1982). The Compartmentation of the Glycolytic and Pentose-Phosphate Pathways in Plants. *Fed Proc* **41**, 629-629.
- Dennis, D.T.** (1989). Fatty acid biosynthesis in plastids. In *Physiology, biochemistry, and genetics of non-green plastids*. Boyer, C.D., Shannon, J.C., Hardison, R.C., eds., Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 120-129.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., and Neill, S.** (2002). A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16314-16318.
- Diallinas, G., and Kanellis, A.K.** (1994). A Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene from Melon Fruit - Cdna Cloning, Sequence and Expression in Response to Development and Wounding. *Plant Mol Biol* **26**, 473-479.
- Diaz, J., Barcelo, A.R., and DeCaceres, F.M.** (1997). Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytol.* **136**, 183-188.

- DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Sanderson, T., Eisley, R.B., and Walker, E.L.** (2004). Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.* **39**, 403-414.
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeek, P.J., Chua, N.H., and Smeekens, S.C.M.** (1997). Sucrose control of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**, 583-595.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dornemann, D., Navakoudis, E., and Kotzabasis, K.** (1996). Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment. *J Photoch Photobio B* **36**, 293-299.
- Douchkov, D., Herbig, A., Koch, G., Mock, H.P., Melzer, M., Stephan, U.W., and Baumlein, H.** (2002). Nicotianamine synthase: Gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of plant iron assimilation. *Plant Soil* **241**, 115-119.
- Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S., Donahue, R., and Edwards, G.E.** (1998). UV-B induction of NADP malic enzyme in etiolated and green maize seedlings. *Plant Cell and Environment* **21**, 63-70.
- Eastmond, P.J., and Rawsthorne, S.** (2000). Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryo. *Plant Physiol.* **122**, 767-774.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for Pcr Analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349-1349.
- Edwards, G.E., and Andreo, C.S.** (1992). Nadp-Malic Enzyme from Plants. *Phytochemistry* **31**, 1845-1857.
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flugge, U.I., and Fischer, K.** (2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol* **128**, 512-522.
- Eicks, M.** (2004). Heterologe Expression und Charakterisierung pflanzlicher Transportproteine. Dissertation. Universität zu Köln.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78-84.

- Elias, B.A., and Givan, C.V.** (1979). Localization of Pyruvate-Dehydrogenase Complex in *Pisum-Sativum* Chloroplasts. *Plant Sci Lett* **17**, 115-122.
- Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S.A., Ribak, O., Dixon, R.A., and Lamb, C.J.** (1990). Abnormal-Plant Development and down-Regulation of Phenylpropanoid Biosynthesis in Transgenic Tobacco Containing a Heterologous Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9057-9061.
- Fabbri, M., Delp, G., Schmidt, O., and Theopold, U.** (2000). Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. *Biochem Biophys Res Co* **271**, 191-196.
- Facchini, P.J.** (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 29-66.
- Facchini, P.J., Bird, D.A., and St-Pierre, B.** (2004). Can Arabidopsis make complex alkaloids? *Trends in Plant Science* **9**, 116-122.
- Faure, J.-D., and Howell, S.H.** (1999). Cytokinin perception and signal transduction. . In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, P.J.J. Hooykaas, M.A. Hall and K.R. Libbenga, eds (Amsterdam: Elsevier Science), 461-474.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B.** (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbing, B., Weber, A., Hausler, R.E., and Flugge, U.I.** (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**, 453-462.
- Fliege, R., Flugge, U.I., Werdan, K., and Heldt, H.W.** (1978). Specific Transport of Inorganic-Phosphate, 3-Phosphoglycerate and Triosephosphates across Inner Membrane of Envelope in Spinach-Chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **502**, 232-247.
- Flores, S., and Tobin, E.M.** (1986a). Benzyladenine Modulation of the Expression of 2 Genes for Nuclear-Encoded Chloroplast Proteins in *Lemna-Gibba* - Apparent Posttranscriptional Regulation. *Planta* **168**, 340-349.
- Flores, S., and Tobin, E.M.** (1986b). Posttranscriptional Regulation of Lhcb Gene-Expression by Benzyladenine. *J Cell Biochem*, 21-21.

- Flugge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., and Eckerskorn, C.** (1989). The Triose Phosphate-3-Phosphoglycerate Phosphate Translocator from Spinach-Chloroplasts - Nucleotide-Sequence of a Full-Length Cdna Clone and Import of the Invitro Synthesized Precursor Protein into Chloroplasts. *Embo Journal* **8**, 39-46.
- Flugge, U.I., Weber, A., Fischer, K., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Waegemann, K., and Soll, J.** (1991). The Major Chloroplast Envelope Polypeptide Is the Phosphate Translocator and Not the Protein Import Receptor. *Nature* **353**, 364-367.
- Flugge, U.I.** (1998). Metabolite transporters in plastids. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 201-206.
- Flugge, U.I.** (1999). Phosphate translocators in plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 27-45.
- French, C.J., Elder, M., Leggett, F., Ibrahim, R.K., and Towers, G.H.N.** (1991). Flavonoids Inhibit Infectivity of Tobacco Mosaic-Virus. *Can J Plant Pathol* **13**, 1-6.
- French, C.J., and Towers, G.H.N.** (1992). Inhibition of Infectivity of Potato-Virus X by Flavonoids. *Phytochemistry* **31**, 3017-3020.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., and Palme, K.** (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**, 661-673.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K.** (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806-809.
- Friml, J.** (2003). Auxin transport - shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 7-12.
- Frisch, D.A., Tommey, A.M., Gengenbach, B.G., and Somers, D.A.** (1991). Direct Genetic Selection of a Maize Cdna for Dihydrodipicolinate Synthase in an Escherichia-Coli Dapa- Auxotroph. *Mol Gen Genet* **228**, 287-293.
- Fry, S.C.** (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **37**, 165-186.
- Fuglevand, G., Jackson, J.A., and Jenkins, G.I.** (1996). UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 2347-2357.
- Gabaldon, C., Ros, L.V.G., Pedreno, M.A., and Barcelo, A.R.** (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.* **165**, 121-130.

- Galili, G.** (1995). Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell* **7**, 899-906.
- Galston, A.W., Kauw-Shawney, R., Altabella, T., Tiburcio, A. F.** (1995). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta* **110**, 197-207.
- Garcia, I., Rodgers, M., Pepin, R., Hsieh, T.F., and Matringe, M.** (1999). Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **119**, 1507-1516.
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 790-792.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., and Palme, K.** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**, 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jurgens, G.** (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Ghislain, M., Frankard, V., Vandenbossche, D., Matthews, B.F., and Jacobs, M.** (1994). Molecular Analysis of the Aspartate Kinase-Homoserine Dehydrogenase Gene from *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Mol Biol* **24**, 835-851.
- Gonzalez-Bayon, R., Kinsman, E.A., Quesada, V., Vera, A., Robles, P., Ponce, M.R., Pyke, K.A., and Micol, J.L.** (2006). Mutations in the *RETICULATA* gene dramatically alter internal architecture but have little effect on overall organ shape in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3019-3031.
- Gould, K.S., McKelvie, J., and Markham, K.R.** (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell and Environment* **25**, 1261-1269.
- Grace, S.C., Logan, B.A., and Adams, W.W.** (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell and Environment* **21**, 513-521.
- Grace, S.C., and Logan, B.A.** (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos T Roy Soc B* **355**, 1499-1510.
- Graham, T.L.** (1995). Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In *Handbook of phytoalexin metabolism and action*. (Danile, M., Purkayastha, R.P. eds) Marcel Dekker, New York, 85-116.

- Graham, T.L.** (1998). Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiol Bioch* **36**, 135-144.
- Grebe, M.** (2004). Ups and downs of tissue and planar polarity in plants. *Bioessays* **26**, 719-729.
- Grsic-Rausch, S., Kobelt, P., Siemens, J.M., Bischoff, M., and Ludwig-Muller, J.** (2000). Expression and localization of nitrilase during symptom development of the clubroot disease in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**, 369-378.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M.** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100-103.
- Hagemeier, J., Schneider, B., Oldham, N.J., and Hahlbrock, K.** (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in Arabidopsis thaliana leaves infected with Virulent or avirulent Pseudomonas syringae pathovar tomato strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 753-758.
- Hahlbrock, K., and Grisebach, H.** (1979). Enzymic Controls in the Biosynthesis of Lignin and Flavonoids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **30**, 105-130.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1989). Physiology and Molecular-Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 347-369.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol* **37**, 285-306.
- Hanke, G., Bowsher, C.G., Jones, M.N., Tetlow, I. and Emes, M.J.** (1999). Proteoliposomes and plant transport proteins. *J. Exp. Bot.* **50**, 1715-1726.
- Hartig, K., and Beck, E.** (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology* **8**, 389-396.
- Hatton, D., Sablowski, R., Yung, M.H., Smith, C., Schuch, W., and Bevan, M.** (1995). 2 Classes of Cis Sequences Contribute to Tissue-Specific Expression of a Pal2 Promoter in Transgenic Tobacco. *Plant J.* **7**, 859-876.
- Hausler, R.E., Schlieben, N.H., Schulz, B., and Flugge, U.I.** (1998). Compensation of decreased triose phosphate phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* **204**, 366-376.

- Hausler, R.E., Schlieben, N.H., and Flugge, U.I.** (2000). Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* **210**, 383-390.
- Hay, A., Barkoulas, M., and Tsiantis, M.** (2006). PINning down the connections: transcription factors and hormones in leaf morphogenesis (vol 9, pg 443, 2006). *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 443-443.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., and Pei, Z.M.** (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**, 1968-1971.
- Heineke, D., Kruse, A., Flugge, U.I., Frommer, W.B., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., and Heldt, H.W.** (1994). Effect of Antisense Repression of the Chloroplast Triose-Phosphate Translocator on Photosynthetic Metabolism in Transgenic Potato Plants. *Planta* **193**, 174-180.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., and Bach, T.J.** (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem* **278**, 26666-26676.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., and Stitt, M.** (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**, 535-551.
- Herbik, A., Koch, G., Mock, H.P., Dushkov, D., Czihal, A., Thielmann, J., Stephan, U.W., and Baumlein, H.** (1999). Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley - A key enzyme for iron homeostasis in plants. *Eur J Biochem* **265**, 231-239.
- Herrmann, K.M.** (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* **7**, 907-919.
- Herrmann, K.M., and Weaver, L.M.** (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.

- Heyl, A., and Schmulling, T.** (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480-488.
- Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.* **119**, 471-479.
- Himmelblau, E., and Amasino, R.M.** (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* **158**, 1317-1323.
- Hollander-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K., and Weiler, E.W.** (2005). Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *J. Plant Physiol.* **162**, 767-770.
- Holloway, P.J.** (1983). Some Variations in the Composition of Suberin from the Cork Layers of Higher-Plants. *Phytochemistry* **22**, 495-502.
- Houba-Herlin, N., Pethe, C., d'Alayer, J., and Laloue, M.** (1999). Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J* **17**, 615-626.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R., and Chapple, C.** (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10045-10050.
- Humphreys, J.M., and Chapple, C.** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 224-229.
- Hutchison, C.E., and Kieber, J.J.** (2002). Cytokinin signaling in *arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, S47-S59.
- Imaizumi, N., Ku, M.S.B., Ishihara, K., Samejima, M., Kaneko, S., and Matsuoka, M.** (1997). Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C3 plant, and a comparison of structure and expression between C3 and C4 genes for this protein. *Plant Mol Biol* **34**, 701-716.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T.** (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Ishihara, A., Asada, Y., Takahashi, Y., Yabe, N., Komeda, Y., Nishioka, T., Miyagawa, H., and Wakasa, K.** (2006). Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* expressing the feedback-resistant anthranilate synthase alpha subunit gene OASA1D. *Phytochemistry* **67**, 2349-2362.

- Ishimaru, K., Ishikawa, I., Matsuoka, M., Ohsugi, R.** (1997). Analysis of a C₄-maize pyruvate,orthophosphate dikinase expressed in C₃ transgenic Arabidopsis plants. *Plant Sci* **129**, 57-64.
- Ishimaru, K., Okawa, Y., Ishige, T. Tobias, D.J., Ohsugi, R.** (1998). Elevated pyruvate,orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃ transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol Plant* **103**, 340-346.
- Jacobs, M., and Rubery, P.H.** (1988). Naturally-Occurring Auxin Transport Regulators. *Science* **241**, 346-349.
- Jameson, P.E.** (1994). Cytokinin metabolism and compartmentation. Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. Ann Arbor, MI: CRC Press, 113-128.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., and Meunier, P.** (1995). Production of the Phytoalexin Resveratrol by Grapes as a Response to Botrytis Attack under Natural Conditions. *J Phytopathol* **143**, 135-139.
- Jensen, P.J., Hangarter, R.P., and Estelle, M.** (1998). Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown Arabidopsis. *Plant Physiol.* **116**, 455-462.
- Journet, E.P., and Douce, R.** (1985). Enzymic Capacities of Purified Cauliflower Bud Plastids for Lipid-Synthesis and Carbohydrate-Metabolism. *Plant Physiol.* **79**, 458-467.
- Kaiser, W.M., Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C.B., Rockel, P., Sonoda, M., and Planchet, E.** (2002). Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* **53**, 875-882.
- Kakimoto, T.** (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677-685.
- Kakimoto, T.** (2003). Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Res* **116**, 233-239.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., and Flugge, U.I.** (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**, 105-117.
- Kaneko, T., Hashimoto, T., Kumpaisal, R., and Yamada, Y.** (1990). Molecular-Cloning of Wheat Dihydrodipicolinate Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17451-17455.

- Kang, F., and Rawsthorne, S.** (1994). Starch and Fatty-Acid Synthesis in Plastids from Developing Embryos of Oilseed Rape (*Brassica-Napus* L). *Plant J.* **6**, 795-805.
- Kang, F., and Rawsthorne, S.** (1996). Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* **199**, 321-327.
- Kao, Y.Y., Harding, S.A., and Tsai, C.J.** (2002). Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol.* **130**, 796-807.
- Kasahara, M., and Hinkle, P.C.** (1977). Reconstitution and Purification of D-Glucose Transporter from Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 7384-7390.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sakakibara, H.** (2004). Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049-14054.
- Kawai, S., Itoh, K., Takagi, S., Iwashita, T., and Nomoto, K.** (1988). Studies on Phytosiderophores - Biosynthesis of Mugineic Acid and 2'-Deoxymugineic Acid in *Hordeum-Vulgare*-L Var *Minorimugi*. *Tetrahedron Lett* **29**, 1053-1056.
- Kawamata, S., Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T., and Oku, H.** (1992). Molecular-Cloning of Phenylalanine Ammonia-Lyase Cdna from *Pisum-Sativum*. *Plant Mol Biol* **20**, 167-170.
- Keller, C.P., Stahlberg, R., Barkawi, L.S., and Cohen, J.D.** (2004). Long-term inhibition by auxin of leaf blade expansion in bean and *arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 1217-1226.
- Khyse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Kim, S., Takahashi, M., Higuchi, K., Tsunoda, K., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2005). Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1809-1818.
- Kinsman, E.A., and Pyke, K.A.** (1998). Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* **125**, 1815-1822.

- Kleinig, H., and Liedvogel, B.** (1980). Fatty-Acid Synthesis by Isolated Chromoplasts from the Daffodil - Energy-Sources and Distribution Patterns of the Acids. *Planta* **150**, 166-169.
- Knappe, S.** (2002). Analyse der Phosphattranslokator-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universität zu Köln.
- Knappe, S., Lottgert, T., Schneider, A., Voll, L., Flugge, U.I., and Fischer, K.** (2003). Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in *Arabidopsis*--AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J* **36**, 411-420.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The Promoter of TI-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koornneef, M.** (1990). Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis information service* **28**, 1-4.
- Koshimizu, K., and Iwamura, H.** (1986). Cytokinins. *Chemistry of Plant Hormones*. (Takahashi, N.) Boca Raton, FL: CRC Press., 153-199.
- Kramer, R., Aquila, H. and Klingenberg, M.** (1977). Isolation of the unliganded adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes. *Biochemistry-Us* **16**, 4949-4953.
- Kreuz, K., and Kleinig, H.** (1984). Synthesis of prenyl lipids in cells of spinach leaf. Compartmentation of enzymes for formation of isopentenyl diphosphate. *Eur J Biochem* **141**, 531-535.
- Kubis, S.E., Pike, M.J., Hill, L.M., and Rawsthorne, S.** (2004). The import of phosphoenolpyruvate by plastids from developing embryos of oilseed rape, *Brassica napus* (L.), and its potential as a substrate for fatty acid synthesis. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1455-1462.
- Kulaeva, O.N., Burkhanova, E.A., Karavaiko, N.N., Selivankina, S.Y., Porfirova, S.A., Maslova, G.G., Zemlyachenko, Y.V., and Borner, T.** (2002). Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *J. Plant Physiol.* **159**, 1309-1316.
- Kutchan, T.M.** (1995). Alkaloid Biosynthesis - the Basis for Metabolic Engineering of Medicinal-Plants. *Plant Cell* **7**, 1059-1070.

- Kutz, A., Muller, A., Hennig, P., Kaiser, W.M., Piotrowski, M., and Weiler, E.W.** (2002). A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **30**, 95-106.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-&.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M., and Pagnussat, G.** (2003). Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 109-136.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A., and Wendehenne, D.** (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**, 1-4.
- Langcake, P., and Pryce, R.J.** (1976). Production of Resveratrol by *Vitis-Vinifera* and Other Members of Vitaceae as a Response to Infection or Injury. *Physiol Plant Pathol* **9**, 77-86.
- Lattanzio, V., Arpaia, S., Cardinali, A., Di Venere, D., and Linsalata, V.** (2000). Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of *Vigna* to aphids. *J Agr Food Chem* **48**, 5316-5320.
- Lee, S.W., Robb, J., and Nazar, R.N.** (1992). Truncated Phenylalanine Ammonia-Lyase Expression in Tomato (*Lycopersicon-Esculentum*). *Journal of Biological Chemistry* **267**, 11824-11830.
- Legocka, J., and Zarnowska, A.** (1999). Role of polyamines in the cytokinin-dependent physiological processes. I. Effect of benzyladenine on polyamine levels during chloroplast differentiation in the tissue culture of *Dianthus caryophyllus*. *Acta Physiol. Plant.* **21**, 349-354.
- Lernmark, U., and Gardestrom, P.** (1994). Distribution of Pyruvate-Dehydrogenase Complex Activities between Chloroplasts and Mitochondria from Leaves of Different Species. *Plant Physiol.* **106**, 1633-1638.
- Letham, D.S., and Palni, L.M.S.** (1983). The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **34**, 163-197.
- Leutwiler, L.S., Meyerowitz, E.M., and Tobin, E.M.** (1986). Structure and Expression of 3 Light-Harvesting Chlorophyll a/B-Binding Protein Genes in *Arabidopsis-Thaliana*. *Nucleic Acids Res* **14**, 4051-4064.

- Lewis, N.G., and Yamamoto, E.** (1990). Lignin - Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**, 455-496.
- Li, H., Culligan, K., Dixon, R.A., and Chory, J.** (1995). CUE1: A Mesophyll Cell-Specific Positive Regulator of Light-Controlled Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**, 1599-1610.
- Li, J., and Last, R.L.** (1996). The Arabidopsis thaliana trp5 mutant has a feedback-resistant anthranilate synthase and elevated soluble tryptophan. *Plant Physiol.* **110**, 51-59.
- Li, L.G., Popko, J.L., Umezawa, T., and Chiang, V.L.** (2000). 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 6537-6545.
- Li, L.G., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S.A., and Chiang, V.L.** (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**, 1567-1585.
- Li, C.X., Potuschak, T., Colon-Carmona, A., Gutierrez, R.A., and Doerner, P.** (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12978-12983.
- Li, S.S., and Strid, A.** (2005). Anthocyanin accumulation and changes in CHS and PR-5 gene expression in Arabidopsis thaliana after removal of the inflorescence stem (decapitation). *Plant Physiol Bioch* **43**, 521-525.
- Liang, X., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.J.** (1989). Developmental and Environmental-Regulation of a Phenylalanine Ammonia-Lyase Beta-Glucuronidase Gene Fusion in Transgenic Tobacco Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9284-9288.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 47-65.
- Lin, C.T., Ahmad, M., and Cashmore, A.R.** (1996). Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.* **10**, 893-902.

- Lin, J.F., and Wu, S.H.** (2004). Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J.* **39**, 612-628.
- Ling, H.Q., Koch, G., Baumlein, H., and Ganai, M.W.** (1999). Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7098-7103.
- Liu, Y.-G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**, 457-463.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* **28**, 465-474.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D., and Sandberg, G.** (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **50**, 309-332.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Nonmanly, J., and Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**, 1090-1104.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., and Schulz, W.** (1989). A Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene from Parsley - Structure, Regulation and Identification of Elicitor and Light Responsive Cis-Acting Elements. *Embo Journal* **8**, 1641-1648.
- Lois, R., and Buchanan, B.B.** (1994). Severe Sensitivity to Ultraviolet-Radiation in an Arabidopsis Mutant Deficient in Flavonoid Accumulation .2. Mechanisms of Uv-Resistance in Arabidopsis. *Planta* **194**, 504-509.
- Lomax, T.L., Coenen, C., and Kim, K.H.** (1995). Auxin Redistribution and Gravitropism - Support for the Cholodny-Went Theory and Regulation by Cytokinin. *J Cell Biochem*, 481-481.
- Lopez-Juez, E., Jarvis, R.P., Takeuchi, A., Page, A.M., and Chory, J.** (1998). New Arabidopsis cue mutants suggest a close connection between plastid- and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol* **118**, 803-815.
- Lynn, D.G., Chen, R.H., Manning, K.S., and Wood, H.N.** (1987). The Structural Characterization of Endogenous Factors from Vinca-Rosea Crown Gall Tumors That Promote Cell-Division of Tobacco Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 615-619.

- Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W.T., Elkind, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.J.** (1994). Increased Disease Susceptibility of Transgenic Tobacco Plants with Suppressed Levels of Preformed Phenylpropanoid Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7802-7806.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.** (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, R.C., Mok, M.C., and Mok, D.W.** (1999a). A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **120**, 553-558.
- Martin, R.C., Mok, M.C., and Mok, D.W.** (1999b). Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 284-289.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E., and Mok, D.W.** (2001). A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5922-5926.
- Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., and Kay, S.A.** (2003). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 223-236.
- Matsubara, Y., Yusa, T., Sawabe, A., Iizuka, Y., and Okamoto, K.** (1991). Studies on Physiologically Active Substances in Citrus-Fruit Peel .20. Structure and Physiological-Activity of Phenyl Propanoid Glycosides in Lemon (*Citrus-Limon* Burm F) Peel. *Agr Biol Chem Tokyo* **55**, 647-650.
- Mattsson, J., Ckurshumova, W., and Berleth, T.** (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.* **131**, 1327-1339.
- Mayfield, S.P.** (1990). Chloroplast gene regulation: interaction of the nuclear and chloroplast genomes in the expression of photosynthetic proteins. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 509-513.
- McGarvey, D.J., and Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.
- McGaw, B.A., and Burch, L.R.** (1995). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* (Davies, P. J., ed.) Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 98-117.
- Miernyk, J.A., and Dennis, D.T.** (1982). Isozymes of the Glycolytic-Enzymes in Endosperm from Developing Castor-Oil Seeds. *Plant Physiol.* **69**, 825-828.

- Miernyk, J.A., and Dennis, D.T.** (1992). A Developmental Analysis of the Enolase Isozymes from Ricinus-Communis. *Plant Physiol.* **99**, 748-750.
- Milborrow, B.V., and Lee, H.S.** (1998). Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the non-mevalonate triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**, 507-512.
- Millar, A.J., and Kay, S.A.** (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15491-15496.
- Miller, J.D., Arteca, R.N., and Pell, E.J.** (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **120**, 1015-1023.
- Minami, E., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N., and Tanaka, Y.** (1989). Structure and Some Characterization of the Gene for Phenylalanine Ammonia-Lyase from Rice Plants. *Eur J Biochem* **185**, 19-25.
- Mishina, T.E., Lamb, C., and Zeier, J.** (2007). Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment* **30**, 39-52.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., and Salgado, I.** (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol.* **130**, 1288-1297.
- Mok, D.W.S., and Martin, R.C.** (1994). Cytokinin Metabolic Enzymes. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. Ann Arbor, MI: CRC Press, 129-134.
- Mok, M.C.** (1994). Cytokinins and plant development - an overview. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. Boca Raton: CRC Press, 155-166.
- Mok, D.W., and Mok, M.C.** (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 89-118.
- Moore, T.S.** (1993). *Lipid metabolism in plants*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Morris, R.O., Bilyeu, K. D., Laskey, J. G., and Cheikh, N. N.** (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328-333.
- Muday, G.K., and DeLong, A.** (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science* **6**, 535-542.

- Muehlbauer, G.J., Somers, D.A., Matthews, B.F., and Gengenbach, B.G.** (1994). Molecular-Genetics of the Maize (*Zea-Mays* L) Aspartate Kinase Homoserine Dehydrogenase Gene Family. *Plant Physiol.* **106**, 1303-1312.
- Murphy, A., Peer, W.A., and Taiz, L.** (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **211**, 315-324.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., and Yamada, Y.** (1998). Crystal structures of two tropinone reductases: Different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4876-4881.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., and Hancock, J.T.** (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 13-16.
- Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., Rosso, M.G., Ache, P., Flugge, U.I., and Schneider, A.** (2005). The arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**, 760-775.
- Niyogi, K.K., and Fink, G.R.** (1992). 2 Anthranilate Synthase Genes in Arabidopsis - Defense-Related Regulation of the Tryptophan Pathway. *Plant Cell* **4**, 721-733.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P., and Murphy, A.S.** (2003). Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**, 999-1002.
- Normanly, J., Cohen, J.D., and Fink, G.R.** (1993). Arabidopsis-Thaliana Auxotrophs Reveal a Tryptophan-Independent Biosynthetic-Pathway for Indole-3-Acetic-Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10355-10359.
- Norris, S.R., Barrette, T.R., and DellaPenna, D.** (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**, 2139-2149.
- Oelmuller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V.K., and Mohr, H.** (1986). Expression of Nuclear Genes as Affected by Treatments Acting on the Plastids. *Planta* **168**, 482-492.
- Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J., and Lamb, C.J.** (1990). Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 837-848.

- Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.N., and Stumpf, P.K.** (1979). Subcellular-Localization of Acyl Carrier Protein in Leaf Protoplasts of Spinacia-Oleracea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 1194-1198.
- Ohlrogge, J.B., and Jaworski, J.G.** (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 109-136.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.C., and Barresinoussi, F.** (1990). Differential Inhibitory Effects of Various Flavonoids on the Activities of Reverse-Transcriptase and Cellular DNA and Rna-Polymerases. *Eur J Biochem* **190**, 469-476.
- Orr, J.D., and Lynn, D.G.** (1992). Biosynthesis of Dehydrodiconiferyl Alcohol Glucosides - Implications for the Control of Tobacco Cell-Growth. *Plant Physiol.* **98**, 343-352.
- Osakabe, K., Tsao, C.C., Li, L.G., Popko, J.L., Umezawa, T., Carraway, D.T., Smeltzer, R.H., Joshi, C.P., and Chiang, V.L.** (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8955-8960.
- Ottenschlager, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K.** (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2987-2991.
- Paciorek, T., and Friml, J.** (2006). Auxin signaling. *J. Cell Sci.* **119**, 1199-1202.
- Parsley, K., and Hibberd, J.M.** (2006). The Arabidopsis PPDK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins. *Plant Mol Biol* **62**, 339-349.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., and Murphy, A.S.** (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 536-548.
- Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J., Makam, S.I., Chen, R.J., Masson, P.H., and Murphy, A.S.** (2004). Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**, 1898-1911.
- Penuelas, J., and Munne-Bosch, S.** (2005). Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci* **10**, 166-169.

- Perovic, D., Tiffin, P., Douchkov, D., Baumlein, H., and Graner, A.** (2007). An integrated approach for the comparative analysis of a multigene family: The nicotianamine synthase genes of barley. *Funct Integr Genomics*.
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalova, E., and Friml, J.** (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914-918.
- Piao, H.L., Lim, J.H., Kim, S.J., Cheong, G.W., and Hwang, I.** (2001). Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* **27**, 305-314.
- Pollmann, S., Muller, A., and Weiler, E.W.** (2006). Many roads lead to "auxin": of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biology* **8**, 326-333.
- Proudlove, M.O., and Thurman, D.A.** (1981). The Uptake of 2-Oxoglutarate and Pyruvate by Isolated Pea-Chloroplasts. *New Phytol.* **88**, 255-264.
- Qi, Q.G., Kleppingersparace, K.F., and Sparace, S.A.** (1994). The Role of the Triose-Phosphate Shuttle and Glycolytic-Intermediates in Fatty-Acid and Glycerolipid Biosynthesis in Pea Root Plastids. *Planta* **194**, 193-199.
- Qi, Q.G., Kleppingersparace, K.F., and Sparace, S.A.** (1995). The Utilization of Glycolytic-Intermediates as Precursors for Fatty-Acid Biosynthesis by Pea Root Plastids. *Plant Physiol.* **107**, 413-419.
- Qin, G.J., Gu, H.Y., Zhao, Y.D., Ma, Z.Q., Shi, G.L., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H.D., Liu, M.H., Chen, Z.L., and Qu, L.J.** (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **17**, 2693-2704.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., and Wagner, D.** (1995). Phytochromes - Photosensory Perception and Signal-Transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Radwanski, E.R., and Last, R.L.** (1995). Tryptophan Biosynthesis and Metabolism - Biochemical and Molecular-Genetics. *Plant Cell* **7**, 921-934.
- Ragab, A.S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J.H., and Bobzin, S.C.** (2006). Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Agr Food Chem* **54**, 7175-7179.

- Rakova, N.Y., and Romanov, G.A.** (2005). Polyamines suppress manifestation of cytokinin primary effects. *Russ J Plant Physiol* **52**, 50-57.
- Rashotte, A.M., Brady, S.R., Reed, R.C., Ante, S.J., and Muday, G.K.** (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of arabidopsis. *Plant Physiol* **122**, 481-490.
- Rédei, G.P., and Hirono, Y.** (1964). Linkage studies. *Arabidopsis information service* **1**, 9-10.
- Reed, J.W., and Chory, J.** (1994). Mutational analyses of light-controlled seedling development in Arabidopsis. *Semin Cell Biol* **5**, 327-334.
- Reed, R.C., Brady, S.R., and Muday, G.K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in arabidopsis. *Plant Physiol* **118**, 1369-1378.
- Reid, E.E., Thompson, P., Lyttle, C.R., and Dennis, D.T.** (1977). Pyruvate-Dehydrogenase Complex from Higher Plant-Mitochondria and Proplastids. *Plant Physiol* **59**, 842-848.
- Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-518.
- Riesmeier, J.W., Flugge, U.I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H.W., Willmitzer, L., and Frommer, W.B.** (1993). Antisense Repression of the Chloroplast Triose Phosphate Translocator Affects Carbon Partitioning in Transgenic Potato Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6160-6164.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., and Kaiser, W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- Rodriguez-Concepción, M., and Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**, 1079-1089.
- Rognes, S.E., Lea, P.J., and Miflin, B.J.** (1980). S-Adenosylmethionine - a Novel Regulator of Aspartate Kinase. *Nature* **287**, 357-359.
- Ros-Barcelo, A., Pomar, F., Lopez-Serrano, M., Martinez, P., and Pedreno, M.A.** (2002). Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Bioch* **40**, 325-332.

- Rosche, E., and Westhoff, P.** (1995). Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C-4 plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant Mol Biol* **29**, 663-678.
- Rusak, G., Krajacic, M., and Plese, N.** (1997). Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antivir Res* **36**, 125-129.
- Sacchettini, J.C., and Poulter, C.D.** (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788-1789.
- Sakurai, N., Katayama, Y., and Yamaya, T.** (2001). Overlapping expression of cytosolic glutamine synthetase and phenylalanine ammonia-lyase in immature leaf blades of rice. *Physiol Plantarum* **113**, 400-408.
- Samach, A., Broday, L., Hareven, D., and Lifschitz, E.** (1995). Expression of an Amino-Acid Biosynthesis Gene in Tomato Flowers - Developmental up-Regulation and Meja Response Are Parenchyma-Specific and Mutually Compatible. *Plant J.* **8**, 391-406.
- Sanchez-Bravo, J., Ortuno, A.M., Botia, J.M., Acosta, M., and Sabater, F.** (1992). The Decrease in Auxin Polar Transport Down the Lupin Hypocotyl Could Produce the Indole-3-Acetic Acid Distribution Responsible for the Elongation Growth Pattern. *Plant Physiol* **100**, 108-114.
- Sandorf, I., and Hollander-Czytko, H.** (2002). Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 173-179.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
- Sathasivan, K., Haughn, G.W., and Murai, N.** (1990). Nucleotide-Sequence of a Mutant Acetolactate Synthase Gene from an Imidazolinone-Resistant *Arabidopsis-Thaliana* Var Columbia. *Nucleic Acids Res* **18**, 2188-2188.
- Sauer, M., Balla, J., Luschnig, C., Wisniewska, J., Reinohl, V., Friml, J., and Benkova, E.** (2006). Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.* **20**, 2902-2911.
- Scherer, G.F.E., and Holk, A.** (2000). NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regul.* **32**, 345-350.

- Scherer, G.F.E.** (2004). NO as a potential second messenger in cytokinin signalling. In Nitric Oxide Signaling in Plants. Magalhaes, J.R., Singh, R.P., and Passos, L.P., eds. Studium Press., LCC, Houston, TX, USA, 149-166.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., and Paul, M.** (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **100**, 6849-6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., and Smeekens, S.** (2004). Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant Physiol. **135**, 879-890.
- Schmid, J., and Amrhein, N.** (1995). Molecular-Organization of the Shikimate Pathway in Higher-Plants. Phytochemistry **39**, 737-749.
- Schmülling, T.** (2004). Cytokinin. Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz, W. and Lane, M.D. eds). Amsterdam: Academic Press/Elsevier Science.
- Schneider, A., Hausler, R.E., Kolukisaoglu, U., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., and Flugge, U.I.** (2002). An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. Plant J. **32**, 685-699.
- Scholz, G., Becker, R., Pich, A., and Stephan, U.W.** (1992). Nicotianamine - a Common Constituent of Strategy-I and Strategy-Ii of Iron Acquisition by Plants - a Review. J Plant Nutr **15**, 1647-1665.
- Schulz, B., Frommer, W.B., Flugge, U.I., Hummel, S., Fischer, K., and Willmitzer, L.** (1993). Expression of the Triose Phosphate Translocator Gene from Potato Is Light-Dependent and Restricted to Green Tissues. Mol Gen Genet **238**, 357-361.
- Schulzesiebert, D., Heineke, D., Scharf, H., and Schultz, G.** (1984). Pyruvate-Derived Amino-Acids in Spinach-Chloroplasts - Synthesis and Regulation during Photosynthetic Carbon Metabolism. Plant Physiol. **76**, 465-471.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell **18**, 1121-1133.
- Schwender, J., and Ohlrogge, J.B.** (2002). Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. Plant Physiol. **130**, 347-361.

- Schwender, J., Ohlrogge, J.B., and Shachar-Hill, Y.** (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29442-29453.
- Shadle, G.L., Wesley, S.V., Korth, K.L., Chen, F., Lamb, C., and Dixon, R.A.** (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* **64**, 153-161.
- Sheahan, J.J.** (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **83**, 679-686.
- Sheen, J.** (1991). Molecular Mechanisms Underlying the Differential Expression of Maize Pyruvate, Orthophosphate Dikinase Genes. *Plant Cell* **3**, 225-245.
- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M., and Goodman, H.M.** (1995). Analysis of *Arabidopsis* Mutants Deficient in Flavonoid Biosynthesis. *Plant J.* **8**, 659-671.
- Shojima, S., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (1989). Establishment of a Cell-Free System for the Biosynthesis of Nicotianamine. *Plant and Cell Physiology* **30**, 673-677.
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Schuch, W., and Bevan, M.** (1993). Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant J* **3**, 835-845.
- Sieburth, L.E.** (1999). Auxin is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**, 1179-1190.
- Siehl, D.L., and Conn, E.E.** (1988). Kinetic and Regulatory Properties of Arogenate Dehydratase in Seedlings of *Sorghum-Bicolor* (L) Moench. *Arch Biochem Biophys* **260**, 822-829.
- Singh, B.K., and Shaner, D.L.** (1995). Biosynthesis of Branched-Chain Amino-Acids - from Test-Tube to Field. *Plant Cell* **7**, 935-944.
- Slabas, A.R., and Fawcett, T.** (1992). The Biochemistry and Molecular-Biology of Plant Lipid Biosynthesis. *Plant Mol Biol* **19**, 169-191.
- Smith, R.G., Gauthier, D.A., Dennis, D.T., and Turpin, D.H.** (1992). Malate-Dependent and Pyruvate-Dependent Fatty-Acid Synthesis in Leukoplastids from Developing Castor Endosperm. *Plant Physiol.* **98**, 1233-1238.
- Soler, E., Clastre, M., Bantignies, B., Marigo, G., and Ambid, C.** (1993). Uptake of isopentenyl diphosphate by plastids isolated from *Vitis vinifera* L. cell suspensions. *Planta* **191**, 324-329.

- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spedding, G., Ratty, A., and Middleton, E.** (1989). Inhibition of Reverse Transcriptases by Flavonoids. *Antivir Res* **12**, 99-110.
- Steliopoulos, P., Wust, M., Adam, K.P., and Mosandl, A.** (2002). Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ¹³C and (²H) labeling studies. *Phytochemistry* **60**, 13-20.
- Stephan, U.W., and Scholz, G.** (1993). Nicotianamine - Mediator of Transport of Iron and Heavy-Metals in the Phloem. *Physiol Plantarum* **88**, 522-529.
- Stitt, M., and Ap Rees, T.** (1979). Capacities of Pea-Chloroplasts to Catalyze the Oxidative Pentose-Phosphate Pathway and Glycolysis. *Phytochemistry* **18**, 1905-1911.
- Strand, A.** (2004). Plastid-to-nucleus signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 621-625.
- Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Hausler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flugge, U.I., and Chory, J.** (1999). The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* **11**, 1609-1622.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**, 1116-1120.
- Subramaniam, R., Reinold, S., Molitor, E.K., and Douglas, C.J.** (1993). Structure, Inheritance, and Expression of Hybrid Poplar (*Populus-Trichocarpa* X *Populus-Deltoides*) Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes. *Plant Physiol.* **102**, 71-83.
- Surpin, M., Larkin, R.M., and Chory, J.** (2002). Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* **14**, S327-S338.
- Suzuki, K., Higuchi, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci Plant Nutr* **45**, 993-1002.
- Suzuki, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (2001). Analysis of upstream region of nicotianamine synthase gene from *Arabidopsis thaliana*: Presence of putative ERE-like sequence. *Biosci Biotech Bioch* **65**, 2794-2797.

- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M.** (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.* **15**, 2648-2653.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**, 1263-1280.
- Takei, K., Sakakibara, H., and Sugiyama, T.** (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **276**, 26405-26410.
- Tal, B., and Robeson, D.J.** (1986). The Metabolism of Sunflower Phytoalexins Ayapin and Scopoletin - Plant-Fungus Interactions. *Plant Physiol.* **82**, 167-172.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., and Martin, C.** (1998a). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C.F., Lynn, D., Dow, J.M., Roberts, K., and Martin, C.** (1998b). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **10**, 1801-1816.
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T.** (1998). Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* **429**, 259-262.
- Teutonico, R.A., Dudley, M.W., Orr, J.D., Lynn, D.G., and Binns, A.N.** (1991). Activity and Accumulation of Cell Division-Promoting Phenolics in Tobacco Tissue-Cultures. *Plant Physiol.* **97**, 288-297.
- Tringali, C., Spatafora, C., Cali, V., and Simmonds, M.S.J.** (2001). Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia* **72**, 538-543.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., and Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin Accumulation in Arabidopsis thaliana during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **98**, 1304-1309.
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., and Tabata, S.** (2001). The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**, 751-755.

- Ushio, Y., Mori, S., Nishizawa, N. K.** (2003). Novel nicotianamine synthase and the AtNAS4 gene in Arabidopsis. Japanese Patent No. 2003-70926.
- Vanderstraeten, D., Rodriguespousada, R.A., Goodman, H.M., and Vanmontagu, M.** (1991). Plant Enolase - Gene Structure, Expression, and Evolution. *Plant Cell* **3**, 719-735.
- Varotto, C., Pesaresi, P., Meurer, J., Oelmuller, R., Steiner-Lange, S., Salamini, F., and Leister, D.** (2000). Disruption of the Arabidopsis photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J.* **22**, 115-124.
- Veit, M., and Pauli, G.F.** (1999). Major flavonoids from Arabidopsis thaliana leaves. *J Nat Prod* **62**, 1301-1303.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., and Friml, J.** (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxindependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521-4531.
- Vinti, G., Fourrier, N., Bowyer, J.R., and Lopez-Juez, E.** (2005). Arabidopsis cue mutants with defective plastids are impaired primarily in the photocontrol of expression of photosynthesis-associated nuclear genes. *Plant Mol Biol* **57**, 343-357.
- Vogel, J.P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I., and Kieber, J.J.** (1998). Isolation and characterization of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**, 417-427.
- Voll, L.** (2001). Die *Arabidopsis thaliana cue1*-Mutante: Die Bedeutung des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators für den Primär- und Sekundärstoffwechsel. Dissertation. Universität zu Köln.
- Voll, L., Hausler, R.E., Hecker, R., Weber, A., Weissenbock, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S., and Flugge, U.I.** (2003). The phenotype of the Arabidopsis *cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J* **36**, 301-317.
- Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Muller, A., Weiler, E.W., and Piotrowski, M.** (2001). Enzymatic characterization of the recombinant Arabidopsis thaliana nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* **212**, 508-516.
- Walker, R.P., Chen, Z.H., Tecs, L.I., Famiani, F., Lea, P.J., and Leegood, R.C.** (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* **210**, 9-18.

- Wang, C.Z., and Jia, Z.J.** (1997). Neolignan glycosides from *Pedicularis longiflora*. *Planta Med* **63**, 241-244.
- Wang, Z.Y., and Tobin, E.M.** (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Wanner, L.A., Li, G., Ware, D., Somssich, I.E., and Davis, K.R.** (1995). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **27**, 327-338.
- Waters, B.M., Chu, H.H., DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Eisley, R.B., Lahner, B., Salt, D.E., and Walker, E.L.** (2006). Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.* **141**, 1446-1458.
- Weaver, L.M., Gan, S.S., Quirino, B., and Amasino, R.M.** (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol* **37**, 455-469.
- Weber, K., and Osborn, M.** (1969). Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 4406-&.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., Neff, M.M., Nguyen, J.T., Sato, S., Wang, Z.Y., Xia, Y., Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Yanofsky, M.F., and Chory, J.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 1003-1013.
- Weisemann, J.M., and Matthews, B.F.** (1993). Identification and Expression of a Cdna from *Daucus-Carota* Encoding a Bifunctional Aspartokinase-Homoserine Dehydrogenase. *Plant Mol Biol* **22**, 301-312.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., and Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 177-183.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F.** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 449-455.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmulling, T.** (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10487-10492.

- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmulling, T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner, T., Kollmer, I., Bartrina, I., Holst, K., and Schmulling, T.** (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371-381.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-590.
- Wingler, A.** (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* **60**, 437-440.
- Wink, M.** (1999). Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Secondary Metabolism*, Annual Plant Reviews, 2, Sheffield Academic, 1-16.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol Plantarum* **107**, 142-149.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Scheres, B., and Friml, J.** (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**, 883-883.
- Wood, H.N., Rennekamp, M.E., Bowen, D.V., Field, F.H., and Braun, A.C.** (1974). A comparative study of cytokinesins I and II and zeatin riboside. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4140-4143.
- Wright, A.D., Sampson, M.B., Neuffer, M.G., Michalczuk, L., Slovin, J.P., and Cohen, J.D.** (1991). Indole-3-Acetic-Acid Biosynthesis in the Mutant Maize Orange Pericarp, a Tryptophan Auxotroph. *Science* **254**, 998-1000.
- Wu, Q.D., Preisig, C.L., and VanEtten, H.D.** (1997). Isolation of the cDNAs encoding (+)6a-hydroxymaackiain 3-O-methyltransferase, the terminal step for the synthesis of the phytoalexin pisatin in *Pisum sativum*. *Plant Mol Biol* **35**, 551-560.

- Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T., Kawamata, S., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T., and Oku, H.** (1992). Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes from *Pisum-Sativum* - Structure, Organ-Specific Expression and Regulation by Fungal Elicitor and Suppressor. *Plant and Cell Physiology* **33**, 715-725.
- Yamasaki, H., Uefuji, H., and Sakihama, Y.** (1996). Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **332**, 183-186.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Ikehara, N.** (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a mechanism for H₂O₂ scavenging in vascular plants. *Plant Physiol.* **114**, 436-436.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Takahashi, S.** (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**, 128-129.
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., and Li-Jia, Q.** (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**, 107-124.
- Yanovsky, M.J., and Kay, S.A.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature* **419**, 308-312.
- Yao, K.N., Deluca, V., and Brisson, N.** (1995). Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora-Infestans*. *Plant Cell* **7**, 1787-1799.
- Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N., Usmanghani, K., and Ahmad, M.** (1990). The Constituents of *Cistanche-Tubulosa* (Schrenk) Hook F .2. Isolation and Structures of a New Phenylethanoid Glycoside and a New Neolignan Glycoside. *Chem Pharm Bull* **38**, 1927-1930.
- Young, J., Liscum, E., and Hangarter, R.** (1992). Spectral-dependence of light-inhibited hypocotyl elongation in photomorphogenic mutants of Arabidopsis: Evidence for a UV-A photosensor. *Planta* **188**, 106-114.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., and Lamb, C.** (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**, 2875-2886.

Zhao, Y.D., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* **16**, 3100-3112.

8. Anhang

8.1 Auswahl deregulierter Gene in *cue1-1* und nach DCG-Fütterung

Tab. 8.1 (Teil 1): Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA und nach DCG-Fütterung, ergänzt mit Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten Mutanten (CKX) und nach Cytokininfütterung (120 min Benzyladenin) (Brenner et al., 2005).

Gene	Function	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h	Col 0-120min BA	CKX
At5g33290	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	-4.59	-4.41				-2.60	
At5g32440	DNA.synthesis/chromatin structure	-3.72	-3.08					
At5g34853	DNA.synthesis/chromatin structure.retrotransposon/transposase	-3.52	-3.54					
At5g32470	not assigned.unknown	-3.30	-3.30					
At5g33280	transport.unspecified anions	-3.25	-2.01					
At5g33320	transport.metabolite transporters at the envelope membrane	-3.10	-3.41					
At3g48390	not assigned.no ontology	-2.71	-1.11					
At3g26210	misc.cytochrome P450	-2.12	-0.88					
At5g08240	not assigned.unknown	-1.99	-0.81					
At1g61340	development.unspecified	-1.75	-0.76					
At1g21100	misc.O- methyl transferases	-1.70	-0.96				-1.62	-5.49
At4g13420	transport.potassium	-1.69	-1.69					
At3g57450	not assigned.unknown	-1.64	-0.91					
At5g34930	not assigned.no ontology	-1.64	-1.52					
At5g24780	development.storage proteins	-1.63	-1.07					
At1g10070	amino acid metabolism.synthesis	-1.60	-0.95					
At3g22460	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group	-1.60	-0.80					
At3g55920	cell.cycle	-1.49	-1.80					
At2g39400	not assigned.no ontology	-1.49	-0.71				1.56	
At4g19420	cell.wall.pectin*esterases.acetyl esterase	-1.48	-0.53					
At3g17860	not assigned.unknown	-1.48	-0.59				1.08	
At5g08710	stress.abiotic.light	-1.47	-1.36					
At3g29035	development.unspecified	-1.42	-0.82					
At5g33300	cell.organisation	-1.39	-2.20					
At4g20410	protein.targeting.secretory pathway.unspecified	-1.37	-1.13					
At4g32940	protein.targeting.secretory pathway.vacuole	-1.36	-1.05					
At2g18050	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	-1.31	-0.88					
At1g22770	development.unspecified	-1.28	-0.85					
At3g51970	secondary metabolism.wax	-1.27	-1.15					
At1g61260	not assigned.unknown	-1.22	-0.94					
At2g21820	not assigned.unknown	-1.20	-0.64					
At4g32340	not assigned.unknown	-1.19	-0.74					
At2g32810	cell.wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	-1.19	-1.62					
At3g03470	misc.cytochrome P450	-1.19	-0.62				1.73	
At1g50590	not assigned.no ontology	-1.11	-1.39					
At5g45340	misc.cytochrome P450	-1.07	-0.71				-1.02	
At4g35350	protein.degradation.cysteine protease	-1.05	-0.51				-1.41	
At2g27080	not assigned.no ontology	-1.04	-0.56					
At5g40720	not assigned.unknown	-1.04	-0.63					
At1g77520	secondary metabolism.phenylpropanoids	-1.02	-0.96					
At3g04350	not assigned.unknown	-0.95	-1.07				1.15	
At5g62740	not assigned.no ontology	-0.90	-1.21					
At4g12690	not assigned.unknown	-0.83	-1.15					
At4g23700	transport.metal	-0.54	-1.30					
At5g58910	secondary metabolism.simple phenols	-0.53	-0.91					
At4g39770	minor CHO metabolism.trehalose.TPP	-0.71	-0.57					
At5g61290	hormone metabolism.abscisic acid synthesis-degradation	-0.70	-1.12					
At1g30040	hormone metabolism.gibberellin.synthesis-degradation	-0.58	1.02					
At1g52800	hormone metabolism.gibberellin.synthesis-degradation	-0.57	-1.06					
At5g43440	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	-1.39	-1.04					
At5g54270	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	-1.72	-0.91					
At5g51790	RNA.regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.73	-1.41					
At2g47270	RNA.regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.50	-1.11				1.54	
At5g28770	RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	-0.99	-1.39				1.40	
At2g25900	RNA.regulation of transcription.C3H zinc finger family	-0.63	-1.00				2.38	
At4g31550	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.65	-0.86				-1.78	
At5g42380	signalling.calcium	-1.84	-0.85					
At4g33050	signalling.calcium	-1.63	-0.77					
At3g26740	signalling.light	-1.41	-1.19				1.01	
At1g70690	signalling.receptor kinases.misc	-1.22	-0.74					
At4g21960	misc.peroxidases	-0.88	-0.69	0.37	1.33		-1.09	
At5g59080	not assigned.unknown	-1.33	-0.67					
At3g01680	not assigned.unknown	-0.56	-1.10			0.58		
At3g19580	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.11	-0.57			-0.71		
At1g14880	not assigned.no ontology	-3.74						
At5g24210	lipid metabolism.lipid degradation.lipases	-3.66						
At1g69720	redox.heme	-3.21						
At2g18690	not assigned.unknown	-3.13						
At4g23810	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor	-2.99					-2.16	
At2g41640	not assigned.unknown	-2.93						
At1g09500	secondary metabolism.phenylpropanoids	-2.88						
At5g55150	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-2.85						
At5g22460	not assigned.no ontology	-2.84						
At5g27420	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-2.78						
At1g68600	not assigned.unknown	-2.46						
At1g57590	cell.wall.pectin*esterases.acetyl esterase	-2.45						
At1g02610	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-2.35						
At1g28480	redox.glutaredoxins	-2.34						

Tab. 8.1 (Teil 2): Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA und nach DCG-Fütterung, ergänzt mit Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten Mutanten (CKX) und nach Cytokininfütterung (120 min Benzyladenin) (Brenner et al., 2005).

Gene	Function	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h	Col_0-120min BA	CKX
At1g32170	cell wall modification	-2.34						
At2g18660	cell wall modification	-2.32						
At3g28510	protein degradation AAA type	-2.30						
At4g25810	cell wall modification	-2.30						
At1g78410	not assigned.no ontology	-2.28						
At3g04210	stress biotic	-2.26						
At3g55840	not assigned.unknown	-2.25						
At2g46430	transport cyclic nucleotide or calcium regulated channels	-2.25						
At1g59590	not assigned.unknown	-2.17						
At5g18470	misc.myrosinases-lectin-jacalin	-2.17						
At1g26380	secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	-2.14					-2.60	-4.40
At4g01360	not assigned.unknown	-2.14						
At5g58670	lipid metabolism.lipid degradation.lysophospholipases	-2.12						
At1g52200	not assigned.no ontology	-2.11						
At5g14730	not assigned.unknown	-2.11						
At5g57220	misc.cytochrome P450	-2.11					-2.96	-3.61
At2g17040	development.unspecified	-2.09						
At5g54610	cell organisation	-2.05						
At1g13340	not assigned.unknown	-2.04						
At1g57990	transport.nucleotides	-2.03					-1.51	-1.29
At3g54150	development.unspecified	-2.03					-1.28	
At1g70290	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS/TPP	-2.02					2.14	
At1g19180	not assigned.unknown	-2.02					-1.40	
At4g37290	not assigned.unknown	-2.00						
At5g24530	secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols	-1.99						
At5g25240	not assigned.unknown	-1.98						
At3g53250	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-2.26						
At4g08040	hormone metabolism.ethylene synthesis-degradation	-2.15						
At1g01480	hormone metabolism.ethylene synthesis-degradation	-1.97						
At2g06050	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation	-1.69						
At3g14440	hormone metabolism.abscisic acid.synthesis-degradation	-1.59						
At5g51190	hormone metabolism.ethylene signal transduction	-1.49						
At3g48100	hormone metabolism.cytokinin signal transduction	-1.39					2.51	
At5g02810	hormone metabolism.abscisic acid signal transduction	-1.35						
At4g37770	hormone metabolism.ethylene synthesis-degradation	-1.31					2.78	
At2g14900	hormone metabolism.gibberellin induced-regulated-responsive-activated	-1.27						
At5g20400	hormone metabolism.ethylene synthesis-degradation	-1.15					-0.98	
At1g06160	hormone metabolism.ethylene signal transduction	-1.09						
At4g32280	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-1.08					3.01	
At1g28370	hormone metabolism.ethylene signal transduction	-1.08						
At4g34410	hormone metabolism.ethylene signal transduction	-1.06						
At1g03400	hormone metabolism.ethylene synthesis-degradation	-1.05						
At1g52100	hormone metabolism.jasmonate.induced-regulated-responsive-activated	1.11					-2.07	
At5g58260	PS.lightreaction.cyclic electron flow-chlororespiration	-0.97						
At2g31040	PS.lightreaction.ATP synthase	-0.79					-1.56	
At4g02630	PS.lightreaction.state transition	-0.74						
At1g52230	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	-0.58						
At1g18570	RNA regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-2.43					-1.68	
At1g73830	RNA regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-2.06						
At3g46080	RNA regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-2.06						
At4g27310	RNA regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-1.97						
At1g68840	RNA regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element	-1.92						
At1g21910	RNA regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element	-1.75						
At4g17460	RNA regulation of transcription.HB.Homeobox transcription factor family	-1.67						
At2g35930	RNA regulation of transcription.PHOR1	-1.64					-2.86	-1.99
At4g16780	RNA regulation of transcription.HB.Homeobox transcription factor family	-1.61					3.71	
At3g46090	RNA regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.56						
At1g25550	RNA regulation of transcription.G2-like transcription factor family, GARP	-1.55						
At5g67450	RNA regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.43					-2.19	
At3g19380	RNA regulation of transcription.PHOR1	-1.43						
At2g23290	RNA regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1.42						
At3g59060	RNA regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.37						
At3g49930	RNA regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.33						
At1g18400	RNA regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.31					1.36	-1.10
At1g44830	RNA regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element	-1.28						
At1g79700	RNA regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element	-1.28						
At5g49450	RNA regulation of transcription.bZIP transcription factor family	-1.25					1.97	
At5g43170	RNA regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.24						
At2g44910	RNA regulation of transcription.HB.Homeobox transcription factor family	-1.23						
At1g48000	RNA regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1.21						
At4g34530	RNA regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.18						
At1g66160	RNA regulation of transcription.PHOR1	-1.15						
At3g58120	RNA regulation of transcription.bZIP transcription factor family	-1.14						
At2g40140	RNA regulation of transcription.C3H zinc finger family	-1.14					-1.23	
At5g24470	RNA regulation of transcription.Psdo ARR transcription factor family	-1.14					1.70	
At4g04840	RNA regulation of transcription.putative DNA-binding protein	-1.06					-2.05	
At5g04150	RNA regulation of transcription.bHLH.Basic Helix-Loop-Helix family	-1.01						
At1g02450	RNA regulation of transcription.unclassified	-3.58						
At5g10760	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.97						
At1g07000	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.77						
At2g42980	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.64					-3.01	-3.23
At5g10770	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.60						
At2g36320	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.09						
At5g61010	RNA regulation of transcription.unclassified	-1.02						
At4g23810	RNA regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-2.99						
At1g80840	RNA regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-2.07						
At5g22570	RNA regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.92						
At2g40750	RNA regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.73						
At3g56400	RNA regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.25						

Tab. 8.1 (Teil 3): Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA und nach DCG-Fütterung, ergänzt mit Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten Mutanten (CKX) und nach Cytokininfütterung (120 min Benzyladenin) (Brenner et al., 2005).

Gene	Function	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h	Col_0-120min BA	CKX
At4g01250	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.24						
At5g13080	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.17						
At5g64810	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.17						
At3g01830	signalling.calcium	-3.22						
At1g76650	signalling.calcium	-2.24						
At5g39670	signalling.calcium	-2.22						
At5g54490	signalling.calcium	-2.20						
At1g73800	signalling.calcium	-2.17						
At1g51890	signalling.light	-1.71						
At1g51820	signalling.light	-1.07						
At3g50840	signalling.light	-1.02						
At3g45860	signalling.receptor kinases.DUF 26	-2.65						
At4g11890	signalling.receptor kinases.DUF 26	-2.01						
At3g22060	signalling.receptor kinases.misc	-1.95						
At1g74360	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat X	-1.71						
At4g23260	signalling.receptor kinases.DUF 26	-1.67						
At3g59700	signalling.receptor kinases.legume-lectin	-1.60					-1.78	-1.31
At3g47570	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XII	-1.56						
At1g01560	signalling.MAP kinases	-1.56						
At3g21930	signalling.receptor kinases.misc	-1.54						
At4g23170	signalling.receptor kinases.misc	-1.53						
At1g21240	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1.45						
At4g23270	signalling.receptor kinases.DUF 26	-1.42					-1.15	
At1g11050	signalling.receptor kinases.RKF3 like	-1.40					-1.05	
At3g21920	signalling.receptor kinases.misc	-1.37						
At1g16130	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1.35						
At4g21390	signalling.receptor kinases.S-locus glycoprotein like	-1.29					-1.66	
At4g23210	signalling.receptor kinases.DUF 26	-1.18						
At5g58350	signalling.MAP kinases	-1.15						
At1g21270	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1.13						
At5g39020	signalling.receptor kinases.Catharanthus roseus-like RLK1	-1.11						
At1g18390	signalling.receptor kinases.wheat LRK10 like	-1.09						
At1g79680	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1.09						
At5g66790	signalling.receptor kinases.wall associated kinase	-1.09						
At1g73500	signalling.MAP kinases	-1.08						
At4g21366	signalling.receptor kinases.misc	-1.05						
At3g08870	signalling.receptor kinases.legume-lectin	-1.03						
At5g01540	signalling.receptor kinases.misc	-1.03					-0.99	-1.58
At1g35710	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XII	-1.01						
At5g48540	not assigned.unknown	-1.14		0.38			-2.58	
At1g17170	misc.glutathione S transferases	-0.55		0.39			-4.33	
At3g44300	misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes	-1.04		0.92				
At1g02205	secondary metabolism.wax	-0.78		0.30				
At2g17500	hormone metabolism.auxin.synthesis-degradation	-1.00		0.41	-0.77		1.07	
At5g25840	not assigned.unknown	-0.58			0.71		1.57	
At1g63800	protein.degradation.ubiquitin.E2	-0.86			0.79			
At5g58570	not assigned.unknown	-0.95			0.83			
At4g23680	stress.abiotic.unspecified	-0.59			0.92			
At1g69410	protein.synthesis.initiation	-0.60			0.98			
At1g01680	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-0.74	0.84		1.12			
At3g02040	lipid metabolism.lipid degradation.lysophospholipases	-1.67	1.14		0.76		1.23	
At5g27280	RNA.regulation of transcription.unclassified	-1.42			0.59			
At5g20250	minor CHO metabolism.affinose family.affinose synthases.putative	-2.39				0.52	1.76	
At1g80440	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-1.98				0.92	3.07	
At1g22370	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	-1.74				0.52		
At1g13650	not assigned.unknown	-1.61				1.34		
At5g12940	not assigned.no ontology	-1.48				0.61		
At4g10120	major CHO metabolism.synthesis.sucrose.SPS	-1.47				0.55		
At4g01330	PS.lightreaction.state transition	-1.41				0.61		
At2g32870	not assigned.no ontology	-1.33				0.82		
At3g05640	protein.posttranslational modification	-1.20				0.68		
At3g26280	misc.cytochrome P450	-1.05				0.61	4.78	
At2g01890	misc.acid and other phosphatases	-1.04				0.83	-1.09	
At1g14240	nucleotide metabolism.degradation	-1.03				0.88		
At3g53800	not assigned.no ontology.armadillo/beta-catenin repeat family protein	-1.03				0.72		
At2g39980	secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins	-0.79				0.73	2.14	1.73
At3g62750	not assigned.no ontology	-0.76				0.57		
At2g39850	protein.degradation.subtilases	-0.74				0.71		
At5g35790	OPP.oxidative PP.G6PD	-0.72				0.59		
At3g48350	Expressed protein	-0.71				0.50	-1.60	
At1g43670	major CHO metabolism.synthesis.sucrose.FBPase	-0.65				0.78		
At4g30690	protein.synthesis.initiation	-0.63				0.56		
At1g73750	not assigned.unknown	-0.63				0.66		
At2g37130	misc.peroxidases	-0.62				0.54	-1.30	
At1g75960	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	-0.59				0.62		
At2g29170	secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	-0.57				0.86		
At5g08410	redox.thioredoxin	-0.54				0.66		
At5g44680	DNA.repair	-0.54				0.58		
At4g35470	not assigned.no ontology	-0.52				0.57		
At5g35170	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.adenylate kinase	-0.51				0.77		
At3g47620	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-0.72				0.72		
At3g27690	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	-1.78				1.09		
At4g01330	PS.lightreaction.state transition	-1.41				0.61		
At1g19150	PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	-0.79				0.77		
At1g14150	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	-0.60				0.67		

Tab. 8.1 (Teil 4): Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA und nach DCG-Fütterung, ergänzt mit Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten Mutanten (CKX) und nach Cytokininfütterung (120 min Benzyladenin) (Brenner et al., 2005).

Gene	Function	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h	Col_0-120min BA	CKX
At2g18300	RNA regulation of transcription bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	-0.72				0.51		
At1g76110	RNA regulation of transcription Nucleosome/chromatin assembly factor group	-0.66				1.09		
At1g21250	signalling, receptor kinases, wall associated kinase	-1.43				0.64		
At1g56120	signalling, receptor kinases, leucine rich repeat VIII-2	-1.26				0.74	-1.41	
At5g34850	misc. acid and other phosphatases		-4.65					
At3g02100	misc. UDP glucosyl and glucuronyl transferases		-3.39					
At5g06900	misc. cytochrome P450		-2.78					
At3g45130	lipid metabolism, 'exotics' (steroids, squalene etc)		-2.63					
At4g17730	cell, vesicle transport		-2.57					
At1g15540	not assigned, no ontology		-2.47					
At5g06905	misc. cytochrome P450		-2.13					
At1g80320	not assigned, no ontology		-2.03					
At3g52970	misc. cytochrome P450		-2.00					
At4g08300	(2A.7.4) Plant Drug/Metabolite Exporter		-1.98				-1.46	-1.78
At1g43800	lipid metabolism, FA synthesis and FA elongation		-1.46				1.13	
At5g24410	OPP, oxidative PP, 6-phosphogluconolactonase		-1.22				-2.03	
At1g20860	transport, phosphate		-1.21					
At2g29130	secondary metabolism, simple phenols		-1.18					
At3g04530	glycolysis, PEPCase		-1.12					
At5g15240	transport, amino acids		-1.11					
At1g52820	hormone metabolism, gibberellin, synthesis-degradation		-2.14					
At3g12830	hormone metabolism, auxin, induced-regulated-responsive-activated		-1.24					
At1g68040	hormone metabolism, salicylic acid, synthesis-degradation		-1.08					
At2g22630	RNA regulation of transcription MADS box transcription factor family		-1.70					
At5g54230	RNA regulation of transcription MYB domain transcription factor family		-1.64					
At1g30210	RNA regulation of transcription, TCP transcription factor family		-1.30					
At4g05330	RNA regulation of transcription, C2H2 zinc finger family		-1.19					
At5g62470	RNA regulation of transcription, MYB domain transcription factor family		-1.07					
At3g46130	RNA regulation of transcription, MYB domain transcription factor family		-1.07				-3.59	
At2g03200	RNA regulation of transcription unclassified		-1.13				-1.20	
At5g03520	signalling, G-proteins		-1.10					
At3g18810	signalling, receptor kinases, proline extensin like		-1.32					
At1g21120	misc. O- methyl transferases		-0.66	0.45			-4.10	
At1g68540	secondary metabolism, phenylpropanoids		-0.62		0.61			
At5g59320	lipid metabolism, lipid transfer proteins etc		-0.58		1.05			
At1g09340	not assigned, unknown		-1.44			0.78		
At1g76080	redox, thioredoxin		-1.03			0.69		
At4g02530	not assigned, no ontology		-0.95			0.61		
At1g22430	misc. alcohol dehydrogenases		-0.82			0.83		
At5g19140	metal handling		-0.68			0.64		
At2g22980	protein, degradation, serine protease		-0.68			0.89	1.16	
At5g02160	not assigned, unknown		-0.64			0.82	1.03	
At5g23240	stress, abiotic, heat		-0.55			0.61		
At4g19160	not assigned, unknown		-0.53			0.76		
At5g26820	transport, metal		-0.50			0.96	-1.07	
At2g33830	hormone metabolism, auxin, induced-regulated-responsive-activated		-0.73			0.60	1.33	
At2g25450	hormone metabolism, ethylene, synthesis-degradation		-0.81			0.69		
At4g21280	PS, lightreaction, photosystem II, PSII polypeptide subunits		-1.49			0.53		
At1g20020	PS, lightreaction, other electron carrier (ox/red), ferredoxin reductase		-0.97			0.74		
At3g50820	PS, lightreaction, photosystem II, PSII polypeptide subunits		-0.90			0.93		
At1g03600	PS, lightreaction, photosystem II, PSII polypeptide subunits		-0.78			0.83	0.97	
At2g20260	PS, lightreaction, photosystem I, PSI polypeptide subunits		-0.53			0.73		
At2g47850	RNA regulation of transcription unclassified		-0.95			0.50		
At5g47110	RNA regulation of transcription unclassified		-0.86			0.74		
At1g09750	RNA regulation of transcription unclassified		-1.59			0.79		
At2g43010	signalling, light		-1.07			0.66		
At1g35910	minor CHO metabolism, trehalose, TPP	0.95	1.08					
At1g78095	DNA, synthesis/chromatin structure, retrotransposon/transposase	0.67	1.05					
At4g04610	S-assimilation, APR	0.90	0.98					
At2g36160	protein, synthesis, misc ribosomal protein	1.14	0.57					
At3g26480	development, unspecified	1.35	1.08					
At3g32240	DNA, synthesis/chromatin structure, retrotransposon/transposase	3.52	1.81					
At4g15500	hormone metabolism, auxin, synthesis-degradation	0.67	1.00					
At5g05130	RNA regulation of transcription, Chromatin Remodeling Factors	1.41	1.33					
At4g00670	RNA regulation of transcription unclassified	0.85	1.26				-2.21	
At5g07180	signalling, receptor kinases, leucine rich repeat XIII	0.64	1.00					
At5g53070	protein, synthesis, misc ribosomal protein	0.75	0.64		-0.53			
At5g15440	stress, abiotic, heat	3.15	0.68			-1.06		
At3g18610	not assigned, no ontology	1.46	0.52			-0.93		
At5g06000	protein, synthesis, initiation	0.77	0.66			-0.49		
At3g09440	stress, abiotic, heat	2.03						
At1g52040	secondary metabolism, sulfur-containing glucosinolates	2.04						
At1g07350	not assigned, no ontology	2.04						
At4g04590	DNA, synthesis/chromatin structure, retrotransposon/transposase	2.27						
At1g23410	protein, degradation, ubiquitin	2.33						
At3g28220	not assigned, no ontology	2.60					1.41	
At3g24420	not assigned, no ontology	2.77						
At2g14630	not assigned, unknown	2.86						
At1g40118	DNA, synthesis/chromatin structure, retrotransposon/transposase	3.14						
At3g56980	RNA regulation of transcription bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	1.00						
At4g26150	RNA regulation of transcription, C2C2(Zn) GATA transcription factor family	1.04						
At5g56860	RNA regulation of transcription, C2C2(Zn) GATA transcription factor family	1.04						
At1g14410	RNA regulation of transcription putative DNA-binding protein	1.04						
At3g18010	RNA regulation of transcription, HB, Homeobox transcription factor family	1.12						
At4g38620	RNA regulation of transcription, MYB domain transcription factor family	1.15						
At5g43630	RNA regulation of transcription, C3H zinc finger family	1.15						
At2g31380	RNA regulation of transcription, C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	1.18						
At1g20220	RNA regulation of transcription putative DNA-binding protein	1.19						
At5g11260	RNA regulation of transcription, bZIP transcription factor family	1.45						
At5g49330	RNA regulation of transcription, MYB domain transcription factor family	1.69						
At1g79220	RNA regulation of transcription unclassified	1.12						

Tab. 8.1 (Teil 5): Auswahl deregulierter Gene (log2-Werte) in *cue1-1* im Vergleich zu pOCA und nach DCG-Fütterung, ergänzt mit Expressionsdaten von Cytokinin-defizienten Mutanten (CKX) und nach Cytokininfütterung (120 min Benzyladenin) (Brenner et al., 2005).

Gene	Function	<i>cue1-1</i> rosette	<i>cue1-1</i> root	DCG 1h	DCG 4h	DCG 24h	Col. 0-120min BA	CKX
A13g52290	signalling, calcium	1.09						
A11g07620	signalling, G-proteins	1.02						
A13g63130	signalling, G-proteins	1.03						
A15g18570	signalling, G-proteins	1.11						
A11g52980	signalling, G-proteins	1.34						
A14g29990	signalling, receptor kinases, leucine rich repeat I	1.19						
A15g67200	signalling, receptor kinases, leucine rich repeat III	1.25						
A15g13930	secondary metabolism, flavonoids, chalcones	2.01			-0.54		-1.63	
A11g24851	not assigned, unknown	1.30			-1.02			
A13g52140	not assigned, no ontology, pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1.02			-0.64			
A15g09590	stress, abiotic, heat	0.95			-0.89			
A13g22980	protein, synthesis, elongation	0.83			-0.55			
A11g20070	not assigned, unknown	0.81			-1.12		-1.64	
A13g55130	transport, ABC transporters and multidrug resistance systems	0.59			-0.80			
A11g16610	misc, gluco-, galacto- and mannosidases	0.57			-0.96			
A15g11590	RNA, regulation of transcription, AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element	1.50			-0.89		-1.16	-0.98
A14g39680	RNA, regulation of transcription, putative transcription regulator	0.55			-0.73			
A15g27120	RNA, regulation of transcription, putative transcription regulator	1.10			-0.93	-0.62		
A11g17960	protein, aa activation	2.66				-0.85		
A13g12860	DNA, synthesis, chromatin structure	1.87				-0.88		
A14g05636	not assigned, unknown	1.71				-0.51		
A15g61880	not assigned, no ontology	1.60				-1.00		
A11g04635	RNA, processing, ribonucleases	1.57				-0.82		
A15g59390	not assigned, no ontology	1.54				-0.98		
A14g15910	stress, abiotic, drought/salt	1.39				-0.72		
A12g20800	mitochondrial electron transport / ATP synthesis, NADH-DH, type II, external	1.30				-1.12		
A15g08640	secondary metabolism, flavonoids, flavonols	1.29				-0.62		
A13g21560	not assigned, no ontology	1.22				-0.77	-2.18	
A14g25630	RNA, processing	1.20				-0.56		
A15g08180	protein, synthesis, misc	1.20				-0.71		
A12g20450	60S ribosomal protein, L14	1.17				-0.52	-1.09	
A12g16570	nucleotide metabolism, synthesis, purine, amidophosphoribosyltransferase	1.16				-0.99		
A11g65060	secondary metabolism, phenylpropanoids, lignin biosynthesis, 4CL	1.13				-0.74		
A13g22660	not assigned, no ontology	1.11				-0.67		
A13g16780	putative ribosomal protein	1.09				-0.49	-1.13	
A13g55120	secondary metabolism, flavonoids, chalcones	1.08				-0.95	-1.52	
A14g12600	protein, synthesis, misc, ribosomal protein	1.06				-0.92		
A11g80750	protein, synthesis, misc, ribosomal protein	1.06				-0.71		
A12g05140	nucleotide metabolism, synthesis, purine, AIR, carboxylase	1.05				-0.60		
A11g48570	RNA, RNA binding	1.03				-0.60		
A14g34740	nucleotide metabolism, synthesis, purine, amidophosphoribosyltransferase	1.01				-0.54		
A11g26540	not assigned, no ontology, agenet domain-containing protein	1.00				-0.62		
A13g61620	DNA, unspecified	0.99				-0.74		
A11g29250	not assigned, unknown	0.99				-0.69		
A13g56070	cell, cycle	0.98				-0.67		
A13g15660	redox, glutaredoxins	0.96				-0.53		
A11g78190	not assigned, unknown	0.96				-0.70		
A11g12830	protein, targeting, peroxisomes	0.93				-0.64		
A12g17670	not assigned, no ontology, pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	0.91				-0.75		
A11g22090	not assigned, unknown	0.91				-0.97		
A11g04870	misc, O- methyl transferases	0.90				-0.69		
A15g42060	not assigned, unknown	0.90				-0.88		
A15g18840	transporter, sugars	0.86				-0.68		
A12g19385	not assigned, no ontology	0.83				-0.66		
A11g71430	not assigned, unknown	0.81				-0.72		
A12g44860	protein, synthesis, misc, ribosomal protein	0.76				-0.75		
A13g02190	protein, synthesis, misc, ribosomal protein	0.75				-0.72		
A15g50810	protein, targeting, mitochondria	0.75				-0.86		
A15g55140	protein, synthesis, chloroplast/mito - plastid ribosomal protein, unknown	0.73				-0.66	1.58	
A15g54970	putative protein	0.72				-0.50	-1.04	
A11g54770	not assigned, unknown	0.68				-0.79		
A12g20940	not assigned, unknown	0.67				-0.72		
A12g34520	protein, synthesis, chloroplast/mito - plastid ribosomal protein, mitochondrial	0.66				-0.72	1.05	
A15g27990	not assigned, unknown	0.64				-0.71		
A13g51240	secondary metabolism, flavonoids, dihydroflavonols	0.63				-1.01	-2.28	
A15g63010	unknown protein	0.59				-0.52	1.45	
A13g07590	RNA, processing	0.57				-0.65		
A13g46210	RNA, processing, ribonucleases	0.54				-0.85		
A11g21520	not assigned, unknown	0.54				-0.91		
A12g27840	RNA, regulation of transcription, HDA	0.88				-0.79	-1.06	
A13g02790	RNA, regulation of transcription, C2H2 zinc finger family	0.81				-0.69		
A13g51800	RNA, regulation of transcription, putative transcription regulator	0.74				-0.56		
A12g24500	RNA, regulation of transcription, C2H2 zinc finger family	0.72				-0.53		
A13g44750	RNA, regulation of transcription, HDA	1.14				-0.52		
A11g80270	RNA, regulation of transcription, putative DNA-binding protein	0.54				-0.51		
A14g25730	RNA, regulation of transcription, putative DNA-binding protein	0.87				-0.51		
A11g23280	RNA, regulation of transcription, unclassified	1.13				-0.61		
A13g49180	signalling, G-proteins	0.93				-0.61		
A11g68290	DNA, synthesis, chromatin structure		2.09					
A15g04120	glycolysis, phosphoglycerate mutase		2.28					
A15g10180	transport, sulphate		2.82					
A12g41510	hormone metabolism, cytokinin synthesis-degradation		1.00					
A15g39750	RNA, regulation of transcription, MADS box transcription factor family		1.04					
A11g01180	RNA, regulation of transcription, AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element		1.11					
A15g12180	signalling, calcium		1.23					
A12g48090	signalling, misc		1.18					
A13g47340	amino acid metabolism, synthesis, aspartate family, asparagine		0.63		-1.21		4.59	-1.04
A15g22300	misc, nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes	-0.83	0.78		-0.89			
A13g49620	not assigned, no ontology		1.38			-1.20		
A15g13210	not assigned, unknown		0.93			-1.04		
A14g18330	protein, synthesis, initiation		0.71			-0.95		
A11g52700	lipid metabolism, lipid degradation, lysophospholipases		0.92			-0.69		
A11g31760	not assigned, no ontology		0.73			-0.63		
A11g08580	not assigned, unknown		0.57			-0.62		
A11g34770	not assigned, no ontology		0.57			-0.58		
A11g69920	misc, glutathione S transferases		0.59			-0.58		
A12g38870	putative protease inhibitor	-0.50	1.29			-0.54	-1.96	-1.60
A11g05680	hormone metabolism, auxin, synthesis-degradation		1.41			-0.61		

8.2 Gehalte an Cytokinin in der *cue1*-Mutante und im Wildtyp

Tab. 8.2a: Cytokiningehalte in Blättern der *cue1*-Mutante und Wildtyp in pmol/g FW (linke Tabelle) und in prozentualen Anteilen vom Wildtyp (rechte Tabelle)

Name	<i>cue1-1</i> Rosette		<i>cue1-6</i> Rosette		pOCA Rosette		Col-0 Rosette	
	pmol/g FW	SD	pmol/g FW	SD	pmol/g FW	SD	pmol/g FW	SD
tZ	0,32	0,03	0,50	0,11	0,41	0,02	0,43	0,03
cZ	0,11	0,03	0,15	0,02	0,10	0,02	0,11	0,03
tZR	0,42	0,05	1,81	0,09	0,48	0,05	0,98	0,15
cZR	1,40	0,26	3,80	1,18	1,11	0,02	1,10	0,20
tZ9G	7,47	1,09	11,01	0,67	9,09	0,71	8,49	1,15
cZ9G	0,60	0,14	0,30	0,04	0,35	0,09	0,20	0,04
dHZ	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
dHZR	0,05	0,01	0,07	0,02	0,05	0,01	0,05	0,00
dHZ9G	0,06	0,02	0,07	0,00	0,05	0,01	0,06	0,01
iP	0,08	0,01	0,14	0,01	0,07	0,03	0,05	0,01
iPR	1,24	0,17	2,75	0,43	0,67	0,02	0,97	0,20
iP9G	4,94	0,29	7,11	0,47	2,41	0,23	3,90	0,63
BAP	0,13	0,10	0,21	0,27	0,12	0,01	0,08	0,05
BAPR	0,03	0,00	0,03	0,02	2,61	2,32	0,03	0,00
BAP9G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
p-T	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
p-TR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-T	0,30	0,05	0,13	0,13	0,14	<LOD	<LOD	<LOD
m-TR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-T9G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-T	0,06	0,02	0,03	0,01	0,04	0,03	0,03	0,01
o-TR	0,15	0,04	0,10	<LOD	0,41	0,38	<LOD	<LOD
o-T9G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K	0,62	0,30	0,96	0,66	0,24	0,13	0,75	0,99
KR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,03	<LOD
tZOG	1,69	0,27	3,54	0,15	3,23	0,36	4,62	0,62
cZOG	0,20	0,07	0,23	0,04	0,06	0,02	0,18	0,06
tZROG	0,37	0,05	0,47	0,12	0,15	0,02	0,27	0,05
cZROG	0,55	0,20	0,80	0,16	0,28	0,02	0,35	0,09
dHZOG	0,25	0,09	0,44	0,08	0,30	0,08	0,47	0,17
dHZROG	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01
p-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
p-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
tZR-5'MP	0,84	0,20	3,71	1,34	0,99	0,13	1,51	0,31
cZR-5'MP	21,22	7,20	32,71	6,63	10,89	3,43	8,07	2,64
dHZR-5'MP	0,16	0,04	0,23	0,05	0,08	0,03	0,10	0,02
iPR-5'MP	3,33	0,58	3,59	0,28	1,02	0,07	1,77	0,34
BAPR-5'MP	<LOD	<LOD	0,09	<LOD	0,16	0,01	0,08	<LOD
p-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
KR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Name	<i>cue1-1</i> Rosette	<i>cue1-6</i> Rosette
	%	%
tZ	79	117
cZ	109	137
tZR	87	185
cZR	126	344
tZ9G	82	130
cZ9G	171	153
dHZ	84	118
dHZR	100	122
dHZ9G	115	114
iP	118	259
iPR	184	284
iP9G	205	182
BAP	101	266
BAPR	1	118
BAP9G	<LOD	<LOD
p-T	<LOD	<LOD
p-TR	<LOD	<LOD
m-T	208	<LOD
m-TR	<LOD	<LOD
m-T9G	<LOD	<LOD
o-T	142	95
o-TR	37	<LOD
o-T9G	<LOD	<LOD
K	257	128
KR	<LOD	<LOD
tZOG	52	77
cZOG	319	132
tZROG	244	175
cZROG	195	225
dHZOG	84	95
dHZROG	332	147
p-TOG	<LOD	<LOD
p-TROG	<LOD	<LOD
m-TOG	<LOD	<LOD
m-TROG	<LOD	<LOD
o-TOG	<LOD	<LOD
o-TROG	<LOD	<LOD
tZR-5'MP	85	246
cZR-5'MP	195	405
dHZR-5'MP	188	219
iPR-5'MP	326	203
BAPR-5'MP	<LOD	121
p-TR-5'MP	<LOD	<LOD
m-TR-5'MP	<LOD	<LOD
o-TR-5'MP	<LOD	<LOD
KR-5'MP	<LOD	<LOD

tZ: trans-Zeatin; cZ: cis-Zeatin; tZR: tZ-Ribosid; cZR: cZ-Ribosid; tZ9G: tZ-9-Glukosid; cZ9G: cZ-9-Glukosid; dHZ: dehydro-Zeatin; dHZR: dHZ-Ribosid; dHZ9G: dHZ-9-Glukosid; iP: Isopentenyladenin; iPR: iP-Ribosid; iP9G: iP-9-Glukosid; BAP: 6' Benzylaminopurin; BAPR: BAP-Ribosid; m-T: meta-Topolin; o-T: ortho-Topolin; o-TR: o-T-Ribosid; K: Kinetin; tZOG: O-glucosyl-tZ; cZOG: O-glucosyl-cZ; tZROG: O-glucosyl-tZ-Ribosid; cZROG: O-glucosyl-cZ-Ribosid; dHZOG: O-glucosyl-dHZ; dHZROG: O-glucosyl-dHZ-Ribosid; tZR-5'MP: tZR-5'monophosphat; cZR-5'MP: cZR-5'monophosphat; dHZR-5'MP: dHZR-5'monophosphat; iPR-5'MP: iPR-5'monophosphat; BAP9G: BAP-9-Glukosid; KR: Kinetinribosid; BAPR-5'MP: BAPR-5'monophosphat

<LOD = Gehalt nicht bestimmt; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Tab. 8.2b: Cytokiningehalte in Wurzeln der *cue1*-Mutante und Wildtyp in pmol/g FW (linke Tabelle) und in prozentualen Anteilen vom Wildtyp (rechte Tabelle)

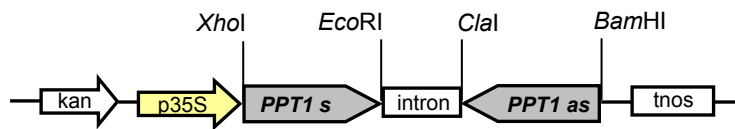
	<i>cue1-1</i> Wurzel	<i>cue1-6</i> Wurzel	<i>cue1</i> Wurzel	pOCA Wurzel	Col-0 Wurzel	Wt Wurzel	<i>cue1</i> Wurzel
Name	pmol/g FW	pmol/g FW	MW	pmol/g FW	pmol/g FW	MW	%
tZ	0,87	0,76	0,82	0,38	0,36	0,37	221
cZ	6,32	0,96	3,64	3,09	1,16	2,12	171
tZR	3,46	4,47	3,96	2,24	2,91	2,58	154
cZR	60,55	59,48	60,01	45,14	12,27	28,71	209
tZ9G	24,72	12,92	18,82	18,47	10,83	14,65	128
cZ9G	0,46	0,37	0,42	0,92	0,32	0,62	67
dHZ	0,05	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	292
dHZR	0,73	0,48	0,60	0,39	0,12	0,26	237
dHZ9G	0,51	0,31	0,41	0,26	0,12	0,19	214
iP	0,37	0,21	0,29	0,19	0,09	0,14	203
iPR	8,34	6,95	7,64	3,79	2,25	3,02	253
iP9G	3,50	1,47	2,49	1,96	1,27	1,62	154
BAP	0,04	0,31	0,18	0,08	0,09	0,09	206
BAPR	0,04	0,03	0,04	0,13	<LOD	0,13	28
BAP9G	0,39	0,09	0,24	0,11	0,08	0,09	258
p-T	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
p-TR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-T	<LOD	0,18	0,18	0,27	<LOD	0,27	65
m-TR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-T9G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-T	0,04	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	136
o-TR	0,16	<LOD	0,16	0,17	<LOD	0,17	92
o-T9G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K	0,24	0,58	0,41	1,74	0,87	1,30	31
KR	0,01	<LOD	0,01	0,11	<LOD	0,11	7
tZOG	9,12	7,42	8,27	5,71	5,59	5,65	146
cZOG	5,10	0,85	2,98	1,88	0,84	1,36	219
tZROG	0,92	0,54	0,73	0,40	0,36	0,38	192
cZROG	30,47	12,43	21,45	11,03	2,37	6,70	320
dHZOG	0,82	0,72	0,77	1,47	0,23	0,85	91
dHZROG	0,27	0,13	0,20	0,07	0,03	0,05	404
p-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
p-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
tZR-5'MP	0,57	0,38	0,47	0,57	0,37	0,47	101
cZR-5'MP	226,82	51,63	139,22	82,56	36,75	59,66	233
dHZR-5'MP	0,84	0,28	0,56	0,39	0,18	0,29	195
iPR-5'MP	1,37	0,48	0,92	0,30	0,20	0,25	373
BAPR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,09	0,09	<LOD
p-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
m-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
o-TR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
KR-5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

tZ: trans-Zeatin; cZ: cis-Zeatin; tZR: tZ-Ribosid; cZR: cZ-Ribosid; tZ9G: tZ-9-Glukosid; cZ9G: cZ-9-Glukosid; dHZ: dehydro-Zeatin; dHZR: dHZ-Ribosid; dHZ9G: dHZ-9-Glukosid; iP: Isopentenyladenin; iPR: iPR-Ribosid; iP9G: iP-9-Glukosid; BAP: 6' Benzylaminopurin; BAPR: BAP-Ribosid; m-T: meta-Topolin; o-T: ortho-Topolin; o-TR: o-T-Ribosid; K: Kinetin; tZOG: O-glucosyl-tZ; cZOG: O-glucosyl-cZ; tZROG: O-glucosyl-tZ-Ribosid; cZROG: O-glucosyl-cZ-Ribosid; dHZOG: O-glucosyl-dHZ; dHZROG: O-glucosyl-dHZ-Ribosid; tZR-5'MP: tZR-5'-monophosphat; cZR-5'MP: cZR-5'-monophosphat; dHZR-5'MP: dHZR-5'-monophosphat; iPR-5'MP: iPR-5'-monophosphat; BAP9G: BAP-9-Glukosid; KR: Kinetinribosid; BAPR-5'MP: BAPR-5'-monophosphat

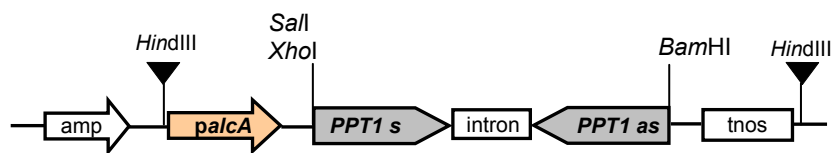
<LOD = Gehalt nicht bestimmt; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

8.3 Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für das EtOH-induzierbare *PPT1*RNAi

(1) pKannibal_*PPT1*RNAi



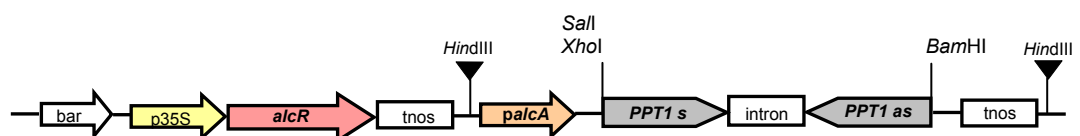
(2) pUCΔalcAN_*PPT1*RNAi



pGreenII_*alcR*



(3) pGreenII_*alcR*alcA:*PPT1*RNAi



8.4 Auflistung der Gene, deren Expression im Rahmen des „Activation tagging“ Ansatzes über RT-PCR untersucht wurde

Tab. 8.4: Auflistung der Gene, die im Bereich der T-DNA-Insertionsstelle in *cue1-1/35Sen1* lokalisiert sind (T-DNA inseriert im 1. Exon des Gens At5g04970). Die Beschreibung, Lokalisation und Funktion der Gene sind dem Programm „TAIR“ entnommen (<http://www.arabidopsis.org>).

AGI ID	Description	Localisation	Function
At5g04920	vacuolar protein sorting 36 family protein / VPS36 family protein, contains Pfam PF04132: Vacuolar protein sorting 36	chloroplast	transporter activity, biological process unknown
At5g04930	putative aminophospholipid translocase (p-type ATPase) involved in chilling response.		
At5g04940	SET domain-containing protein, SUVH1	nucleus	histone methyltransferase activity, regulation of gene expression, epigenetic, flower, leaf, stem
At5g04950	nicotianamine synthase, putative, similar to nicotianamine synthase (Lycopersicon esculentum) (GI:4753801), nicotianamine synthase 2 (Hordeum vulgare) (GI:4894912)		nicotianamine synthase activity
At5g04960	pectinesterase family protein, contains Pfam profile: PF01095 pectinesterase		pectinesterase activity, cell wall modification, flower
At5g04970	pectinesterase, putative, contains similarity to pectinesterase from Vitis vinifera GI:15081598, Prunus persica SP Q43062; contains Pfam profile PF01095 pectinesterase		pectinesterase activity, cell wall modification, flower
At5g04980	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein, contains similarity to inositol polyphosphate 5-phosphatase I		cellular component unknown, hydrolase activity, inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity, biological process unknown
At5g04990	sad1/unc-84 protein-related, contains weak similarity to Sad1/unc-84 protein-like 1 (Swiss-Prot:O94901) (Homo sapiens)	nuclear envelope	molecular function unknown, biological process unknown
At5g05000	translocate of chloroplast 34 (TOC34) / GTP-binding protein (OEP34)		
At5g05010	clathrin adaptor complexes medium subunit-related, contains pfam profile: PF00928 adaptor complexes medium subunit family		molecular function unknown, intracellular protein transport, clathrin vesicle coat

8.5 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt.

PPT1for	agt gct gag gaa ggt gat aac	Nr. 26
PPT1rev	agc cat cag ggc gag aga ca	Nr. 25
barrev	tcc agc tgc cag aaa ccc acg tca	Nr. 30
barfor	gcg gtc tgc acc atc gtc aac cac tac	Nr. 59
Actin2for	tgt acg cca gtg gtc cta caa cc	Nr. 17
Actin2rev	gaa gca aga atg gaa cca ccg	Nr. 18

LCD1dnafw	ccg tta tct gtt gat ctc att att ct	Nr. 79 (lcd1-084529)
LCD1for	gcg gct act gaa caa att aaa gg	Nr. 116 (lcdrnafw)
LCD1rev	tta cga agc ata gcc cat gat ct	Nr. 117 (lcdrnarev)

At5g32440for	ccg att cct cct tct tcc tca	Nr. 129
At5g32440rev	cga ttc tct ttg ccg ctt ct	Nr. 130
At5g32470for	gtg tca cag cac caa gcg tg	Nr. 131
At5g32470rev	tga act ggc cgc aga ttg t	Nr. 132
At5g33280for	gga ttc gct aat aac ctc gcc	Nr. 133
At5g33280rev	cac cat agg ccc tgc ctt t	Nr. 134
At5g33290for	tca tgc cat gac tgg gta cgt	Nr. 135
At5g33290rev	gaa ctc gtcg gttg att tcc c	Nr. 136
At5g34850for	cca caa aac gac ccc agc ta	Nr. 141
At5g34850rev	act gcc ttg tct ctg acc ttg ag	Nr. 142

At5g04920fw	acc aag aat tgt ccc gcc a	Nr. 147
At5g04920rev	tgg tcg ctt tga tcc att cac	Nr. 148
At5g04930fw	aga caa att gca gcg tgg tgt	Nr. 149
At5g04930rev	gcg acc ttc ttg tcc gct tat	Nr. 150
At5g04940fw	gtc taa tgg caa cgc gga act	Nr. 151
At5g04940rev	tcc gtt tct ccc ttg aca acc	Nr. 152
At5g04950fw	tca cat cca tcg tat tgg cca	Nr. 153
At5g04950rev	cgt gcg atc aca acc gag tta	Nr. 154
At5g04960fw	tgg tga ggc ttt agc gga agt	Nr. 155
At5g04960rev	tac aac cgc agc gtt tcc a	Nr. 156
At5g04970fw	ccg taa gaa aca atg cgg atg	Nr. 159
At5g 04970rev	cgg ttg tac cat tcc att cca	Nr. 160
At5g04980fw	acg aac gcc gca gaa act ta	Nr. 161
At5g04980rev	tcc atc acc gtg cca aag a	Nr. 162
At5g04990fw	cgg tga gcc tgg aca atg ttt	Nr. 163
At5g04990rev	ttc gtt ccc aca aca gga acc	Nr. 164
At5g05000fw	ttg gtc tct cgc aca aga tcg	Nr. 165
At5g05000rev	atg gca tct tcc gct gtt ctc	Nr. 166
At5g05010fw	aga ccc atc cca aca tca acc	Nr. 167
At5g05010rev	tga atc cac tgg agg cac aac	Nr. 168

Activation tagging:

LR32	act cga ttc tca acc cga aag tat aga tcc ca	Nr. 91
LR26	act cga ttc tca aac cga aag tat ag	Nr. 92
APL16	pho-tat ggg atc aca tta a-C7-Aminolink	Nr. 93
APL17	pho-cgt ggg atc aca tta a-C7-Aminolink	Nr. 94
pEn1	att ggt aat tac tct ttc ttt tcc tcc ata	Nr. 95 (pSKI015En1)
pEn14	gcc tat aaa tac gac gga tcg taa ttt gtc g	Nr. 108 (pSKI015En14)

Enolase:

Efor1	cag gat gat tgg agc tca tgg	Nr. 13 (AtEfor)
Erev1	cga cat atc tct gag cat ctg	Nr. 14 (AtErev)

Efor2	ggt tta gca agc gga cag atc	Nr. 180 (AtERNAfor2)
Erev2	gtg atc gga aag ctt cac cg	Nr. 181 (AtERNArev2)

PPDK:

Pfor	C6-amino aca ttg gag ctt ccc tcg ctg a	Nr. 4 (AtPPDKgenfor)
Prev	act tgt tcg ctc tcg ggc tat c	Nr. 3 (AtPPDKgenrev)
Pfor2	gtt cga act gag aca agc cct	Nr. 191 (PPDK_4forw)
Prev2	cca gga cat gaa agt ctc caa a	Nr. 192 (PPDK_4rev)

Primer für die Klonierung des *PPT1*RNAi-Konstruktes:

PPT1ri1for	aag gat ccg ctc cgc cgt att ctc cct ctc t	Nr. 45
PPT1ri1rev	aaa tcg atg cca agt tcc aaa acc ttc gtc a	Nr. 46
PPT1ri2for	aac tcg agg ctc cgc cgt att ctc cct ctc t	Nr. 35
PPT1ri2rev	aag gta ccg cca agt tcc aaa acc ttc gtc a	Nr. 60

Die Orientierung der angegebenen Primersequenzen ist stets von 5' nach 3'. Oligonukleotide, welche ausschließlich für Sequenzierungen verwendet wurden, sind nicht aufgeführt.

Ich danke...

Prof. Dr. U.-I. Flügge für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung und stetige Hilfsbereitschaft sowie für die langjährige Finanzierung.

Prof. Dr. S. Waffenschmidt für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Rainer E. Häusler für die außerordentliche Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft sowie für die vielen Ideen, Denkanstöße und Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit.

Dr. Lars Voll für die nette und humorvolle Einarbeitung in das *cuel*-Thema, für seine Hilfe und zahlreichen Tipps.

Kirsten Bell für ihre Hilfe im Labor, vor allem bei unserem „Großprojekt“ und in der „Endphase“ sowie für die zahlreichen amüsanten Momente, die mir den Laboralltag sehr erleichtert haben.

Meiner „Nachbarin“ Bettina Berger für ihre ständige Hilfsbereitschaft, vor allem in „Photoshop“-Krisensituationen und für die netten gemeinsamen „Schoko-Pausen“.

Esther Meißner und Inga Rollwitz sowie Kirsten und Bettina für die schöne, lustige und einfach unvergessliche Zeit im und außerhalb des Labors.

Sharis Haghnazarian für ihre psychologische Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Vertrauen.

Den ehemaligen Mitarbeitern Hildegard Voll und Dr. Silke Knappe für die praktische Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung von Transportexperimenten.

Sonja Hetfeld für die Durchführung der Microarrays.

Dr. Frank Ludewig für das Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Unserer ehemaligen Sekretärin Frau S. Lorbeer für die Hilfe bei administrativen Problemen und für ihre aufmunternden Worte sowie Frau Schwanitz für die ebenfalls unkomplizierte Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Den Mitarbeitern der Gärtnerei für die Bereitstellung unzähliger Aussaatschalen und für die sorgsame Pflege diverser Mutanten.

Siegfried Werth für die zahlreichen Fotoarbeiten.

Der Werkstatt des Botanischen Instituts für die freundliche und kreative Lösung technischer Probleme.

Dr. Miroslav Strnad (Palacký Universität Olomouc, Tschechien) für die Messungen der Cytokinin-Gehalte.

Dr. Alexander Christmann (TU München) für die Durchführung der Pflanzen-Pfropfungen.

Prof. Dr. Bernd Weisshaar und Dr. Ralf Stracke (Universität Bielefeld) für die Hilfe bei der HPTLC-Analyse zur Bestimmung von Flavonoidgehalten.

Allen Mitgliedern der AG-Flügge für das unvergleichlich gute und lockere Arbeitsklima sowie die allgemeine Hilfsbereitschaft.

Meinem Freundeskreis aus dem Sauerland, v.a. Uta Hentschel für die gegenseitige „Telefonseelsorge“.

Nicht zuletzt meiner Familie, vor allem meinen Eltern für ihre jahrelange Unterstützung.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Teilpublikationen:

Knappe, S., Löttgert, T., Schneider, A., Voll, L., Flügge, U.-I., Fischer, K. (2003)
Characterization of two functional *phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT)* genes in Arabidopsis – *AtPPT1* may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. The Plant Journal, 36, 411-420

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Löttgert, T., Voll, L., Knappe, S., Fischer, K., Schneider, A., Fiene, G., Häusler, R.E., Flügge, U.-I.
Der plastidäre Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator aus Arabidopsis, AtPPT1: Ein Steuerelement der Mesophyllentwicklung?
17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen (2004) Poster

Löttgert, T., Voll, L., Knappe, S., Fischer, K., Schneider, A., Häusler, R. E., Flügge, U.-I.
The plastidic phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) in Arabidopsis, defective in the Arabidopsis thaliana *cuel*-mutant: a regulatory element of mesophyll development?
Botanikertagung in Braunschweig (2004) Poster

Löttgert, T., Voll, L., Knappe, S., Fischer, K., Schneider, A., Häusler, R. E., Flügge, U.-I.
The plastidic phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) in Arabidopsis, defective in the Arabidopsis thaliana *cuel*-mutant: a regulatory element of mesophyll development?
XVII. International Botanical Congress, Vienna (2005) Poster

Kurzzusammenfassung

Die *Arabidopsis thaliana cue1*-Mutante weist einen Defekt in einem Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (AtPPT1) auf und zeigt einen retikulierten Blattphänotyp sowie verkürzte Wurzeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden experimentelle Ansätze zur Klärung der Verbindung zwischen dem Funktionsverlust des AtPPT1 und den Störungen der Entwicklungsprozesse in der *cue1*-Mutante verfolgt. Durch Fütterung der Mutanten mit dem Neolignan Dehydrodiconiferylalkohol-Glukosid (DCG) sowie dem Cytokinin trans-Zeatin, konnte der aberrante Blattphänotyp revertiert werden. Nach „*Activation tagging*“ im *cue1*-Hintergrund wurde eine Revertante isoliert, die eine Nicotianaminsynthase überexprimiert. Mit Hilfe genomweiter Expressionsanalysen wurde nach „Kandidatengen“ gesucht, die möglicherweise in eine, die Mesophyllentwicklung steuernde Signaltransduktionskette eingebunden sind, die in *cue1* gestört ist. Dabei wurde die potentielle Rolle von AtPPT1 und nachgeschalteten Reaktionen innerhalb Cytokinin-sensitiver Prozesse näher beleuchtet. Weiterhin wurde die Bedeutung einer vollständigen plastidären Glykolyse für die stromagebundene Bereitstellung an PEP untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Ausfall der potentiell plastidären Enolase zu Wachstumseinschränkungen in den, für die Enolase heterozygoten *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten geführt hat. Zudem konnten keine homozygoten *p-enolase* x *cue1-1* Doppelmutanten generiert werden.

Abstract

The *Arabidopsis thaliana cue1* mutant is defective in a plastidic phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (AtPPT1) and shows a reticulate leaf phenotype and retarded roots. The aim of this work was to analyse the link between the loss of AtPPT1 and the impairments in developmental processes in the *cue1* mutant. The aberrant leaf phenotype could be rescued by feeding the neolignan dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DCG) or the cytokinin trans-zeatin to the mutant. Using an *activation tagging* approach in the *cue1* background, a revertant overexpressing a gene encoding a nicotianamine synthase has been isolated. Genome-wide expression profiling was used as a tool in the search for candidate genes that could be involved in a signal transduction cascade triggering mesophyll

development, which is impaired in *cue1*. Therefore, the potential role of PPT1 and downstream pathways in cytokinin-sensitive processes is discussed. Furthermore, the occurrence of a complete stromal glycolytic pathway could contribute to the supply of PEP as substrate for the shikimate pathway. The loss of the putative plastidic enolase resulted in retardations in growth and development of the heterozygous *enolase* x *cue1-1* double mutants and to lethal homozygous double mutants.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Tanja Löttgert
Geburtsdatum:	03.03.1975
Geburtsort:	Altena
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Wolfgang Löttgert Christa Löttgert, geb. Bardenheuer
Geschwister:	Kay Löttgert

Schulbildung

1981-1985	Grundschule Linscheid
1985-1994	Burggymnasium Altena mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

1994-1997	Ausbildung zur Fremdsprachensekretärin bei der Bayer AG Leverkusen
-----------	---

Studium

Oktober 1997	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für das Studienfach Biologie
Juli 2001	Diplomprüfung im Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Mikrobiologie und Umwelthygiene
August 2001- Juli 2002	Diplomarbeit am Botanischen Institut der Ruhr-Universität Bochum im Hauptfach Botanik; Durchführung der Arbeiten am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Kempken
November 2002- April 2007	Dissertation am Institut für Botanik der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I. Flügge